

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**



**ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS EN GENES RELACIONADOS CON EL  
EMBARAZO, LA LACTANCIA MATERNA Y EL EJE GH-IGF-I EN PACIENTES  
CON CÁNCER DE MAMA**

**POR**

**Q.F.B. HAZYADEÉ FRECIA RODRÍGUEZ GUTIÉRREZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO  
DE MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN  
BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**

**AGOSTO, 2017**

**ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS EN GENES RELACIONADOS CON EL EMBARAZO, LACTANCIA MATERNA Y EL EJE GH-IGF-1 EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA.**

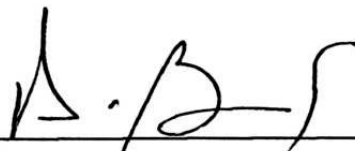
**Aprobación de la Tesis:**



**Dr. C. María de Lourdes Garza Rodríguez**  
Directora de Tesis



**Dr. C. Antonio Alí Pérez Maya**  
Co-Director de Tesis



**Dr. C. Hugo Alberto Barrera Saldaña**  
Comisión de Tesis



**Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez**  
Subdirector de Estudios de Posgrado

## AGRADECIMIENTOS.

Agradezco a la **Dra. en C. Lourdes Garza Rodríguez** por permitirme crecer y aprender de usted, por toda su experiencia que fue fundamental para el desarrollo de este proyecto y el mío propio, por la pizza, el pastel, los tacos, Guadalajara, Edinburg y entre otras cosas, queda por siempre mi admiración y gratitud.

**Dr. en C. Antonio Ali Pérez Maya**, gracias por todo su tiempo, sus consejos, por su valiosa enseñanza, que me permitió concluir este trabajo y crecer profesionalmente y por toda la confianza que puso en mí, queda por siempre mi admiración y gratitud.

**Dr. en C. Hugo Alberto Barrera Saldaña** gracias por brindarme su valiosa colaboración y orientación en el desarrollo de este trabajo.

**Dr. en C. Ricardo Cerda Flores** muchas gracias por todo su apoyo y paciencia, para que yo entendiera la estadística

**Daniela Monsivais** un millón de gracias por tu amistad y apoyo, gracias a ti todo siempre fue más fácil

**Mariel Oyervides** Friendships can end, boyfriends can end only lab partner has no end, un millón de gracias por todo Mariel, por ser como eres, por estar conmigo, por todo lo que me enseñaste, por las alitas, por tu tiempo, por las risas, por hacer esto más fácil.

**Kame Galan** eres un gran ser humano y científico, te admiro mucho, gracias por todo lo que me enseñaste y sobre todo por tu amistad

**Joseluis (Cuerna) Ángel Quiñones** muchas gracias por su ayuda y amistad

**Fernanda Briones y Alan Medellín.** Muchas gracias por las 150 muestras que recolectamos, este proyecto es nuestro, pero el título es mío. Jejeje los quiero mucho.

**Normita, Juany y Ariadna** muchas gracias por toda su ayuda, ustedes son el alma de este departamento

**Matacanes 1 y 2 Florencia y Aidé respectivamente, los Los Stephen (Montse y Stephen) y Juanito.** le agradezco mucho a Dios por ponerlos en mi camino, son unas personas muy importantes para mí, les agradezco absolutamente todo bueno y malo, gracias por ser mi familia y nunca dejarme sola, los quiero mucho y siempre podrán contar conmigo. La verdad es que si volvería a ir a matacanes y volvería a vivir con ustedes en el hacinamiento PD. Si algún día les toca ser revisores de un artículo mío recuerden los buenos tiempos y déjenlo pasar jajajaja.

**Ana Itzel Zarazúa, Alejandro Cerna, Jorge González,** muchas gracias por todos los momentos que compartimos, las risas, por todo el apoyo sobre todo por su amistad los quiero mucho

**Mi mamita bonita Martha Gutiérrez** eres el mejor Químico del mundo, gracias por creer en mí cada vez que se me ocurre algo nuevo, todos los días le doy gracias a Dios por ti, porque todo lo que soy y puedo ser es por ti, **mi papá Jesús Rodríguez** gracias por tu apoyo, por tu cariño y confianza, te quiero papá; **mi hermanito Jemael Rodríguez** gracias por todo tu cariño, eres mi hermano favorito en el mundo mundial, te quiero mucho; **Tia Norma** gracias porque usted siempre ha sido mi apoyo y mi punto de equilibrio te quiero mucho. A dios doy gracias por sus vidas los quiero mucho

A mis amigas de toda la vida **Marlein Garcia, Yohana Quintana, Mariele Mireles,** muchas gracias por tantos años de amistad ustedes saben cómo llegue aquí las quiero mucho

## Dedicatoria.

A los mejores químicos del mundo **QFB Martha Elvia Gutiérrez Fernández y Dr. en C Oliverio Santiago Rodríguez Fernández** sepan que todos mis ideales, esfuerzos y logros han sido inspirados en ustedes, Gracias por su cariño y apoyo incondicional, pero, sobre todo, por creer en mí.



## INDICE

<b>CAPÍTULO I : INTRODUCCIÓN</b>	<b>11</b>
1 Biología del Cáncer.	11
2 EL Cáncer de mama (CM).	11
3 Epidemiología mundial del CM.	11
3.1 Epidemiología del CM en México	12
4 Etiología y factores asociados al riesgo de CM.	13
4.1 Edad y género.	14
4.2 Maternidad y Lactancia.	15
4.3 Menarquia y menopausia	15
5 Clasificación molecular del CM	17
6 Genética del CM.	18
6.1 Genes de alta penetrancia	18
6.2 Genes de moderada penetrancia.	19
6.3 Genes de baja penetrancia.	19
7 Desarrollo de la glándula mamaria.	20
8 Sistema ducto – alveolar.	23
9 Relación del embarazo con el riesgo al DESARROLLO DE CM.	24
10 Edad del embarazo y el riesgo a CM.	27
11 Lactancia materna y CM	28
12 Función del eje de la hormona del crecimiento (GH) y el factor de crecimiento tipo insulínico (IGF-I) en el desarrollo de la glándula mamaria.	28
13 Función de la hormona somatomotropina coriónica humana (CSH) en el desarrollo de la glándula mamaria	29
14 FUNCIÓN de la prolactina (PRL) en el desarrollo de la glándula mamaria	29
<b>CAPÍTULO II: ANTECEDENTES</b>	<b>31</b>
15 Alelos de riesgo PARA CM en los genes GH1 e IGF-I.	31
16 Alelos de riesgo a CM en los genes de PRL y PRLR	31
 Alelos de riesgo a CM en los genes CSH1	 32

<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>33</b>
<b>HIPÓTESIS.</b>	<b>34</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>35</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>35</b>
<b>ESTRATEGIA GENERAL.</b>	<b>36</b>
<b>CAPÍTULO III: MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>38</b>
17    Diseño del Estudio.	38
18    Lugar de realización del Estudio.	38
19    Población Estudiada.	38
20    Variables de estudio.	39
21    Criterios de Inclusión y Exclusión.	40
22    PROCEDIMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO	40
23    PRUEBA PILOTO	42
24    ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS	42
25    AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN PROMOTORA DE GH1	44
26    ELECTROFORESIS AMPLIFICACIÓN DE LA REGION PROMOTORA GH1	47
27    Purificación del templado	47
28    CUANTIFICACIÓN DE ADN EXTRAÍDO	48
29    CICLO DE SECUENCIACIÓN	48
30    Purificación del producto de PCR de secuenciación.	49
31    ENSAMBLE DE SECUENCIAS	50
32    ANÁLISIS DE SECUENCIAS	50
33    ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS	50
34    IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS SNP'S	50
<b>CAPÍTULO IV: RESULTADOS</b>	<b>51</b>
35    Características clínicas, patológicas y epidemiológicas de la población en estudio.	51
36    Factores reproductivos.	54
37    Características clínicas del grupo de casos	56

<b>38</b>	<b>Genotipificación por PCR tiempo real</b>	<b>58</b>
<b>39</b>	<b>Prueba piloto</b>	<b>59</b>
<b>40</b>	<b>Frecuencias genotípicas en los genes GH1 (SNP rs2665802) y CSH1 (SNP rs2955245).</b>	<b>60</b>
<b>41</b>	<b>Frecuencias genotípicas en el gen igf-1 (snp rs35765 y snp rs2955245).</b>	<b>61</b>
<b>42</b>	<b>Frecuencias genotípicas en el gen de la prl (snp rs2244502 y snp rs9466314)</b>	<b>63</b>
<b>43</b>	<b>Frecuencias genotípicas en el gen prlr (snp rs13436213 y snp rs34024951)</b>	<b>64</b>
<b>44</b>	<b>Secuenciación de la región promotora del gen GH1</b>	<b>66</b>
<b>45</b>	<b>Amplificación de la región promotora de GH1</b>	<b>66</b>
	<b>68</b>	
<b>46</b>	<b>Análisis de las secuencias</b>	<b>69</b>
<b>CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN</b>		<b>72</b>
<b>CAPÍTULO V CONCLUSIONES</b>		<b>77</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>		<b>78</b>

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Incidencia de tumor maligno de mama en mujeres de 20 años y más, por entidad federativa	13
Figura 2 Factores de riesgo a CM. Los factor ambientales y hormonales pueden incrementar el riesgo de padecer CM	14
Figura 3 CM hereditario y esporádico	20
Figura 4 Desarrollo de la glándula mamaria	22
Figura 5 Desarrollo de los lóbulos de la glándula mamaria	24
Figura 6 Diferenciación de los lóbulos de la glándula mamaria	26
Figura 7 Edad y riesgo a desarrollar CM	27
Figura 8 Interacciones de los genes GH1, IGF-I, PRL, PRLR, CSH1 en el desarrollo de la glándula mamaria	30
Figura 9 Estrategia general	37
Figura 10 Sondas TaqMan	44
Figura 11 Región promotora del gen GH1	45
Figura 12 Sitio de la metástasis	56
Figura 13 Tipo histológico de CM y estadio clínico	57
Figura 14 Grafica de discriminación alélica	58
Figura 15 Gel de agarosa al 2% con amplicón en la región promotora del gen GH1	68
Figura 16 Análisis de secuencias con el programa CodonCode Aligner.	69
Figura 17 Región promotora del gen GH1	70
Figura 18 Receptor de unión de hormonas tiroideas/ esteroideas.	71



## INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Subtipos moleculares de CM.	17
Tabla 2 Criterios de inclusión y de exclusión para los casos y controles	40
Tabla 3 Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP)	43
Tabla 4 Condiciones de genotipificación por PCR-Tiempo Real	43
Tabla 5 Oligonucleótidos para la región promotora de GH	46
Tabla 6 Concentraciones de reactivos para amplificación de la región promotora del gen GH1	46
Tabla 7 Programa de temperaturas para la amplificación de la región promotora de GH1	46
Tabla 8 Purificación de la muestra con ExoSap	47
Tabla 9 Condiciones para ciclo de secuenciación de la región promotora de GH1	48
Tabla 10 BigDye Xterminator Purification kit	49
Tabla 11 Lugar de Nacimiento, Rango de edad y Edad promedio	52
Tabla 12 Nivel nutricional de los grupos caso-control	53
Tabla 13 Consumo de alcohol y tabaco	53
Tabla 14 Edad de la menarquia y menopausia	54
Tabla 15 Uso de anticonceptivos orales y reemplazo hormonal	54
Tabla 16 Factores reproductivos	55
Tabla 17 Ubicación del tumor y metástasis	56
Tabla 18 Marcadores inmuno-histoquímicos.	57
Tabla 19 Prueba piloto	59
Tabla 20 Frecuencias genotípicas en los genes GH1 (SNP rs2665802) y CSH1 (SNP rs2955245).	61
Tabla 21 Frecuencias genotípicas de los SNP rs35765 y rs2955245 (IGF-1).	62
Tabla 22 Frecuencias genotípicas de los SNP rs2244502 y rs9466314 (PRL).	64
Tabla 23 Frecuencias genotípicas de los SNP rs13436213 y rs34024951 (PRLR)	65
Tabla 24 Gel de agarosa representativo al 2% en muestras de CM	67

## ABREVIATURAS

1000G	Proyecto de los 1000 genomas
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AO	Anticonceptivos orales
CM	Cáncer de mama
CSH	Somatomamotropina coriónica humana
CSH1	Gen de la somatomamotropina corionica humana
EHW	Equilibrio de Hardy-Weinberg
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
GH	Hormona del crecimiento
GH1	Gen de la hormona de crecimiento
gr	Gramos
IARC	Agency for Reserch on Cancer
IGF-I	Factor de crecimiento tipo insulico I
Lob	Lóbulos
min	Minuto
N	Tamaño de la muestra
OR	Odd ratio
pb	Pare de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PRL	Prolactina
PRLR	Receptor de la prolactina
RE	Receptor de estrógenos
RP	receptor de progesterona
seg	Segundo
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante -beta
UBM	Unidad de biotecnología medica

## RESUMEN

**Introducción:** Actualmente se ha establecido que la predisposición hereditaria al cáncer de mama (CM) involucra genes de susceptibilidad de alta, moderada y baja penetrancia. Estos últimos, han sido de gran interés dada su utilidad diagnóstica en diversas poblaciones y etnias, a pesar, de que confieren un bajo riesgo para el desarrollo de CM, ya que estos genes son muy frecuentes en la población y podrían explicar el 22 % de los casos de CM (1). Se han identificado diferentes polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) asociados al CM, como el rs2665802 (GH1) donde se ha encontrado que el alelo A confiere una protección contra el cáncer de colon (2,3), los SNPs rs35765 y rs2162679 en el gen IGF-1 se han asociado con un efecto protector para el CM (4) y el rs2244502 (en la PRL) se ha asociado a riesgo de CM en una población Alemana (5). La contribución de todas estas variantes en población mexicana aun es desconocida.

**Objetivo:** Identificar polimorfismos en genes involucrados en el embarazo, la lactancia y el eje GH- IGF-I asociados al desarrollo del cáncer de mama en mujeres del noreste de México.

**Metodología:** La población estudiada la conformaron 635 mujeres, a las cuales se les extrajeron muestras de ADN de leucocitos y se resguardaron en el Laboratorio Nacional Biobanco del Conacyt. Se analizaron SNP's de cuatro genes: rs2665802 de la GH1, el rs35765 y rs2162679 en el gen IGF-1, el rs2244502 de la PRL y los SNPs rs34024951 y rs13436213 del PRLR. Se genotipificaron 307 pacientes con CM y 328 controles (sin CM) para cada SNP. El genotipado se realizó empleando la técnica de PCR-tiempo real con sondas TaqMan.

Para la búsqueda de nuevos polimorfismos en la región promotora de la GH1 empleamos la secuenciación Sanger. Se utilizó el programa MAXLIK para determinar las frecuencias génicas y el equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW), con el programa EPISOD se estimó el riesgo relativo (Odds ratio OR).

**Resultados:** La obesidad y el uso de AO fueron identificados como factores de riesgo de desarrollar CM en la población estudiada. Se identificó que los polimorfismos rs2665802 rs34024951 en los genes GH1 y PRLR confieren un efecto protector en la población estudiada. Se encontraron 2 nuevas variantes en el promotor de GH1 que podrían estar implicadas en el riesgo a desarrollar CM.

## **CAPÍTULO I : INTRODUCCIÓN**

### **1 BIOLOGÍA DEL CÁNCER.**

El cáncer es un proceso patológico caracterizado por la proliferación celular incontrolada que resulta en la aparición de una masa (tumor) (1). El desarrollo del cáncer (oncogénesis) se debe a mutaciones en genes que regulan el crecimiento celular y la muerte celular programada (apoptosis) (1). En el cáncer hereditario, las mutaciones que dan lugar a la neoplasia se presentan en la línea germinal y por lo tanto se encuentra en todas las células del organismo. Sin embargo, la mayor parte de los cánceres son esporádicos y estos se originan debido a mutaciones en las células somáticas, las cuales posteriormente se dividen y dan lugar al tumor. Independientemente de que el cáncer sea esporádico a consecuencia de mutaciones somáticas, o bien se presente en varios individuos de una familia como rasgo hereditario, el cáncer es una enfermedad genética (1)

### **2 EL CÁNCER DE MAMA (CM).**

Este tipo de cáncer resulta de la proliferación maligna de las células epiteliales que revisten a los conductos o lobulillos de la mama y se produce a consecuencia de alteraciones genéticas en células somáticas o germinales que interfieren con el control normal del crecimiento y con la proliferación celular (1).

### **3 EPIDEMIOLOGIA MUNDIAL DEL CM.**

El CM es actualmente el cáncer más frecuente y el de mayor mortalidad entre las mujeres del mundo, tanto en los países desarrollados como en países en vías de desarrollo (2). La Agencia Internacional para Investigación sobre el Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés (International Agency for Reserch on Cancer) reportó en el 2012 una incidencia de 14.1 millones de nuevos casos en todo el mundo, de los cuales 8 millones se produjeron en países en vías de desarrollo, lo cual corresponde

a alrededor del 82% de la población del mundo. Se estima que en el año 2012 se presentaron 8.2 millones de muertes (alrededor de 22,000 diarias) de las cuales 2.9 millones se produjeron en los países económicamente desarrollados y 5.3 millones en los países en desarrollo (2). Los países económicamente desarrollados, presentan una alta incidencia de cánceres de mama, colo-rectal y pulmón, mientras que en los países en vías de desarrollo los más frecuentes son el de CM, el cervico-uterino y el de pulmón (2).

### **3.1 EPIDEMIOLOGIA DEL CM EN MÉXICO**

El CM es un problema de salud pública, prioritario por su magnitud y trascendencia. Se relaciona con las transiciones demográficas y epidemiológicas del país, con el envejecimiento de la población y con una mayor exposición a los factores de riesgo (Figura 1) (3). Durante el 2013, el CM fue la principal causa de morbilidad hospitalaria y la segunda causa de mortalidad entre los tumores malignos en la población mexicana de 20 años en adelante; 3 de cada 10 mujeres fueron hospitalizadas por dicha causa (5). A partir del 2014 se ha presentado una incidencia más alta de CM, con 28.75 casos nuevos por cada 100,000 mujeres de 20 años y más. Por edad se ha observado que antes de los 64 años hay un aumento en los casos nuevos de tumores malignos de mama conforme se incrementa la edad de la mujer, siendo el grupo 60 a 64 años donde se encuentra la mayor incidencia (68 por cada 100, 000 mujeres del grupo de edad entre 25 a 44 años) a 51.98 (45 a 49 años) (5). En el 2014 se reportó que por entidad federativa, los estados de Campeche, Colima, Aguascalientes y Veracruz fueron los estados con el mayor número de casos nuevos, por el contrario, los estados de Guerrero, Nayarit y México, son los de menor incidencia (5) El estado de Coahuila presenta la tasa más alta de mortalidad en mujeres de 20 años seguido por la Ciudad de México y Nuevo León, mientras que los estados de Oaxaca, Guerrero y Campeche presentan una menor incidencia. Se pronostica que para el año 2030 la incidencia de CM en México será de 24,000 nuevos casos en mujeres menores

de 60 años, de los cuales 5,000 serán mortales. Esto representa un gran reto para el sistema de salud en México (5).



Figura 1 Incidencia de tumor maligno de mama en mujeres de 20 años y más, por entidad federativa (5)

#### 4 ETIOLOGÍA Y FACTORES ASOCIADOS AL RIESGO DE CM.

La etiología del CM es compleja, actualmente se han descrito factores de riesgo que permiten identificar a las personas con una mayor predisposición a la enfermedad. Entre estos factores se destacan los genéticos, los familiares y la edad. Otro grupo de factores de riesgo importantes son los hormonales, los reproductivos y los ambientales. La combinación de estos factores ha incrementado la prevalencia del CM en la población femenina a nivel mundial (Figura2)(5).

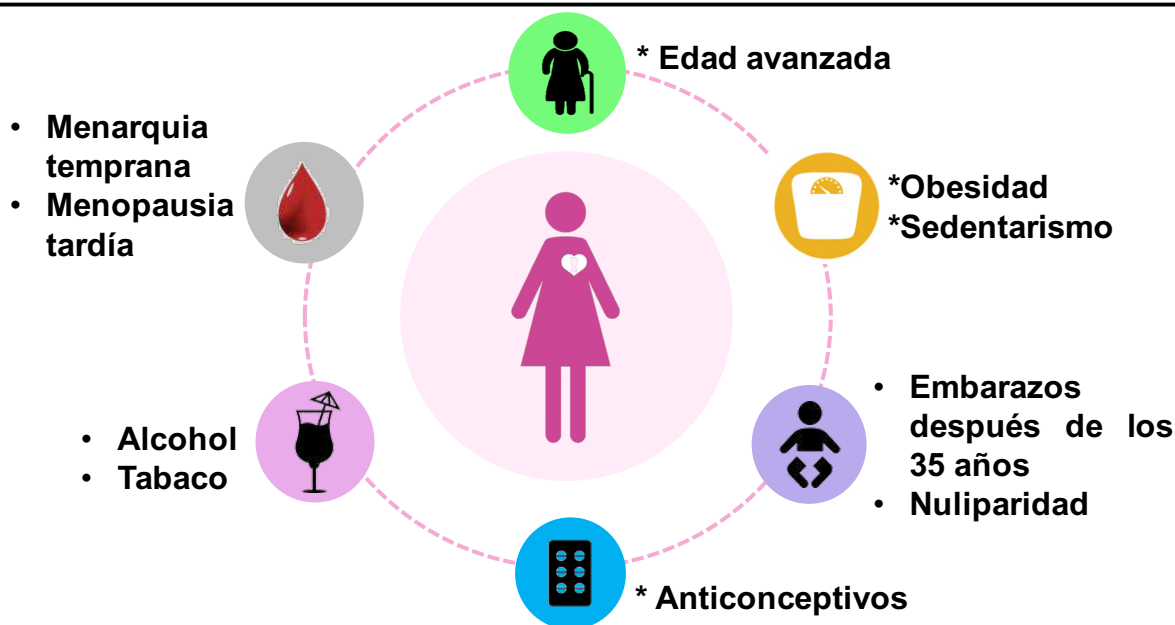


Figura 2 Factores de riesgo a CM. Los factores ambientales y hormonales pueden incrementar el riesgo de padecer CM.

#### 4.1 EDAD Y GÉNERO.

La edad y el género son factores muy importantes debido a que, a diferencia de otros factores, no se pueden controlar. El CM se presenta 100 veces más en mujeres que en hombres, debido a que las células de la glándula mamaria son blanco de muchas hormonas durante la pubertad, el embarazo y la lactancia. El riesgo se incrementa con la acumulación de ciclos ováricos, disminuyendo un 15% por año de retraso de la menarquia y aumentando un 3% por año de retraso de la menopausia.

El riesgo del CM se incrementa con la edad, presentándose principalmente a partir de los 40 años y aumentando a medida que avanza la edad hasta la menopausia, posterior a la menopausia el riesgo continúa incrementándose, pero a una velocidad menor, esto puede deberse a la disminución de estrógenos circulantes.

## **4.2 MATERNIDAD Y LACTANCIA.**

Se ha asociado una disminución al riesgo de CM en mujeres con embarazos a término antes de los 30 años de edad y/o multíparas, de forma independiente (6). Existe un incremento transitorio en el riesgo al CM posterior a los últimos 5-10 años del último embarazo, principalmente en mujeres cuyos embarazos fueron después de los 30 años. Estudios previos sugieren que la lactancia por periodos mayores a 1 año juega un papel importante en la reducción del riesgo a desarrollar CM.

## **4.3 MENARQUIA Y MENOPAUSIA**

Las mujeres con menarquias tempranas y/o menopausias tardías presentan un riesgo aumentado a padecer CM de 1.8 y 2.5 veces más, respectivamente. (5)

## **4.4 ALCOHOL**

La ingesta de bebidas alcohólicas ha sido asociada con un aumento del riesgo a padecer CM, este aumenta con relación a la cantidad de gr de alcohol consumidos, en mujeres que no consumen alcohol el riesgo es menor con relación con las mujeres que consumen una bebida alcohólica diaria. Aquellas mujeres que toman de 2 a 5 bebidas al día tienen un incremento 1 ½ veces más de riesgo que las mujeres que no toman alcohol (5) (8)

## **4.5 TERAPIA HORMONAL.**

Estudios previos ha demostrado que el uso prolongado de estrógenos está asociado con un incremento del riesgo a padecer CM y este se mantiene por cinco años posteriores a la finalización de la terapia hormonal, después de este tiempo se iguala al de las mujeres que nunca usaron terapia de remplazo hormonal. La administración simultanea de estrógeno y progestágenos, continuos o



secuenciales incrementa aún más el riesgo (51% si la administración fue por más de 5 años) (5).

#### **4.6 FACTORES GENÉTICOS Y FAMILIARES.**

Los factores genéticos son determinantes en el riesgo a desarrollar CM, incrementándose el riesgo individual de padecer la enfermedad proporcionalmente con el número de familiares afectados. Aproximadamente en el 5 al 10% (9) de los casos de CM se ha identificado un componente genético asociado a genes de alta penetrancia, como BRCA1, BRCA2 y p53. Variaciones genéticas en los genes como PALB1, BRIP, ATM o CHEK2 están asociadas con un riesgo moderado. La suma de los genes de alta y baja penetrancia representan un 25% de los casos de CM, por lo que se infiere que la suma de variables en genes de baja penetrancia tiene un efecto en el riesgo a padecer CM (9).

## 5 CLASIFICACIÓN MOLECULAR DEL CM

El CM se clasifica con base en el estadio clínico, la morfología celular y el análisis inmunohistoquímico, estos factores proporcionan información para determinar que terapia es más adecuada para cada subtipo en la (Tabla 1) se muestran los subtipos de CM (9).

Tabla 1 Subtipos moleculares de CM [modificado 9)

Subtipo	Inmunofenotipo	Comportamiento
<b>Luminal A</b>	RE(+) y/o RP(+); HER2/neu(-)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Subtipo más común y menos agresivo. Buen pronóstico</li> <li>• Bajo grado histológico. Respuesta hormonal.</li> <li>• Asociado a incremento de edad</li> </ul>
<b>Luminal B</b>	RE(+) y/o RP(+); HER2/neu(+)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Similar al subtipo Luminal A. Peor resultado que el subtipo Luminal A.</li> <li>• Más frecuentemente RE(+)/RP(-)</li> </ul>
<b>Basal</b>	RE(-); RP(-);HER2/neu(-) CK5/6 y/o EGFR(+)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Subtipo agresivo.</li> <li>• Alto grado histológico e índice mitótico.</li> <li>• Riesgo en edades menores (&lt;40años.)</li> <li>• Mas frecuentemente en mujeres premenopáusicas afroamericanas</li> </ul>
<b>HER2/neu(+);RE(-)</b>	RE(-);RP(-);HER2/neu(+)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Menos común. Subtipo altamente agresivo</li> <li>• Alto grado histológico.</li> <li>• Riesgo en mujeres &lt;40 años, mayor que el subtipo luminal.</li> <li>• La etnia afroamericana puede ser un factor de riesgo</li> <li>• Resultado mejorado por HER2/neu (+)</li> </ul>

## **6 GENÉTICA DEL CM.**

El CM es una enfermedad multifactorial en la que los factores genéticos y ambientales contribuyen a su aparición. En un pequeño porcentaje de los casos, se presenta una mutación en la línea germinal en un gen de alta penetrancia de predisposición al cáncer, el cual es considerado un factor determinante para la aparición de la enfermedad [3]. El cáncer de mama esporádico, se ha identificado que está asociado a diferentes factores de riesgo como: edad, cambios hormonales, estilo de vida, historia familiar entre otros, que a su vez se han asociado a alelos de baja penetrancia o polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), los cuales confieren bajo riesgo para el desarrollo de CM. Los SNPs son relativamente comunes en la población, lo cual podría explicar el 22% de los CM que no presentan mutaciones en genes de alta penetrancia.

### **6.1 GENES DE ALTA PENETRANCIA**

Las mutaciones en genes de alta penetrancia presentan una baja frecuencia en la población (0.1%) y están asociados con un incremento de 10 a 20 veces el riesgo de presentar cáncer (10). Los genes BRCA1 y BRCA2 pertenecen a este grupo, mutaciones en estos genes son la causa más frecuente de CM hereditario. En este caso, los cambios genéticos se encuentran en la línea germinal y son transmitidos de generación en generación, las familias con mutaciones en estos genes tienen alrededor del 80 % de posibilidades de desarrollar CM (Figura 3).

## **6.2 GENES DE MODERADA PENETRANCIA.**

Estos genes presentan una baja frecuencia en la población ( $\leq 0.6\%$ ) representan un riesgo de 2 a 4 veces de desarrollar CM. Los genes que se han asociado a esta categoría están involucrados en mecanismos de reparación de ADN (10). Los portadores de mutaciones en genes de moderada penetrancia presentan un riesgo aproximadamente de 6 al 10% a desarrollar CM a los 60 años con respecto a la población general que presenta un 3%

## **6.3 GENES DE BAJA PENETRANCIA.**

El CM esporádico se presenta en el 90 al 95% de los casos y se han asociado estos casos a genes de baja penetrancia (11).

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) confieren un riesgo de bajo a moderado para el desarrollo de CM y estos son relativamente frecuentes en la población. El incremento del riesgo que confieren todos los alelos de baja penetrancia actualmente identificados es muy bajo y varían entre 1.05 a 1.30 en heterocigotos y 1.20 a 1.65 en homocigotos para el alelo de riesgo (12). Se ha estimado que debido a sus altas frecuencias alélicas (560/1000), el riesgo poblacional es del 22 % (14). Una variante de baja penetrancia puede aumentar ligeramente el riesgo, sin embargo, la combinación de SNP puede conferir un riesgo mayor para desarrollar CM (Figura 3).

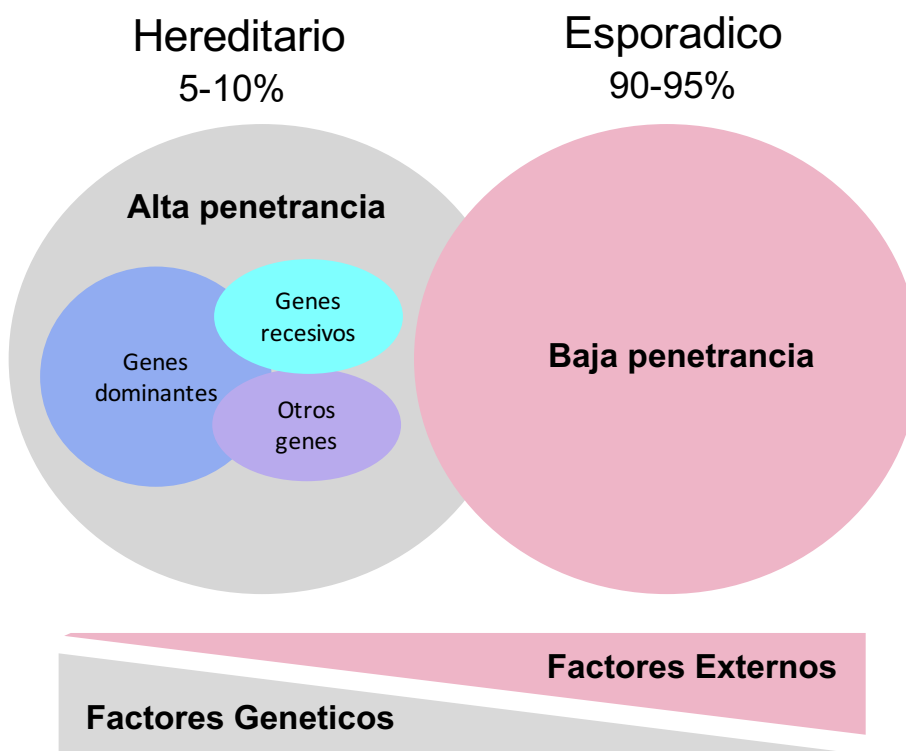


Figura 3 CM hereditario y esporádico. El CM hereditario se presenta del 5 al 10% de los casos y este se presenta por mutaciones en línea germinal mientras que el CM esporádico representa del 90-95% de los casos y está asociado a genes de baja penetrancia

## 7 DESARROLLO DE LA GLÁNDULA MAMARIA.

Durante la embriogénesis, los cambios en la mama son dirigidos por el tejido mesenquimal, mientras que durante la pubertad y en la edad adulta, las hormonas liberadas por la glándula pituitaria y ovario son las que inducen los cambios en la mama. El tejido epitelial de la glándula mamaria se compone principalmente de dos tipos de células: basales y luminales (7). El epitelio basal consiste en células mioepiteliales, las cuales se generan al exterior de la mama y una población pequeña de células madre. El epitelio luminal forma los ductos y los alveolos este

contiene una población de células las cuales son definidas por el estatus de sus receptores hormonales, en conjunto las células mioepiteliales y luminarias generan la bicapa, la estructura tubular la cual ejerce su función durante la lactancia cuando las células mioepiteliales se contraen para liberar la leche del interior de los alveolos (luminar).

La mama se desarrolla principalmente en tres etapas: embrionaria, pubertad y reproductiva. Durante la etapa embrionaria la glándula mamaria se desarrolla a partir de la quinta semana de gestación con la invaginación del ectodermo en el mesodermo de la región axilar con lo que se inicia el desarrollo de los conductos mamarios, de forma que en los neonatos, sean hembras o varones, el tejido mamario está formado por los conductos galactóforos, quedando en estado de reposo subdesarrollado hasta la pubertad (7). Durante la pubertad se inicia el funcionamiento del eje hipotálamo – hipófisis – ovario y la glándula mamaria es el blanco de estrógenos y progesterona que en conjunto con otras hormonas tróficas (GH, Insulina, cortisol, hormonas tiroideas) favorecen la proliferación dando origen a sistema ducto- lobulillar ramificado rodeado de estroma y tejido adiposo.

Durante el embarazo la glándula mamaria finaliza su desarrollo debido a una serie de eventos moleculares que modifican su estructura para permitir la lactancia (Figura 4).

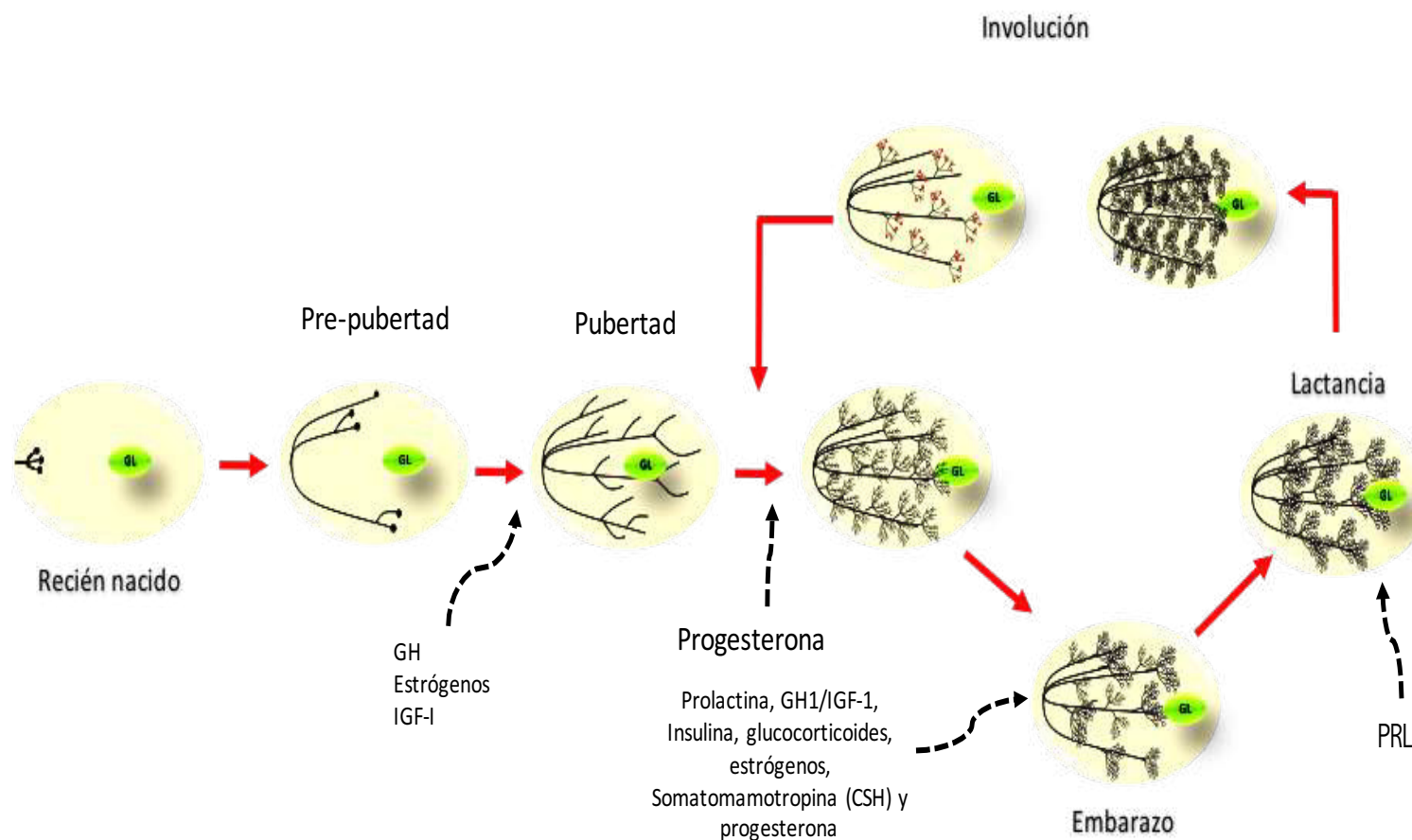


Figura 4 Desarrollo de la glándula mamaria. La glándula mamaria inicia su desarrollo en la 4ta semana de gestación, durante la pubertad esta es blanco de hormonas como GH, IGF- y finalmente durante el embarazo finaliza su desarrollo influenciado por las hormonas GH-IGF-I, PRL, estrógenos, CSH y progesterona (modificado de ref 7) .

## **8 SISTEMA DUCTO – ALVEOLAR.**

El sistema ducto-alveolar presenta diferencias histológicas en las distintas etapas del desarrollo mamario, que dan origen a la clasificación de lóbulos (Lob) mamarios en 4 tipos (Figura 5):

Lob 1: Predomina en las nulíparas, caracterizado por ser altamente proliferativo y poco diferenciado.

Lob 2 y 3: se encuentran en estadios en progresión de la madurez del desarrollo mamario donde disminuye la proliferación epitelial y aumenta la diferenciación. Hay un aumento en el número de conductos, pero disminuye la celularidad. Este tipo de lóbulos se encuentran en menor cantidad en la nulípara, siendo muy escasos los lob 3.

Lob 4: se desarrolla únicamente en el embarazo y es el momento en que culmina el desarrollo mamario por la acción conjugada de la prolactina (PRL) y el lactógeno placentario (CSH). El epitelio se caracteriza por ser poco proliferativo y altamente diferenciado, con gran cantidad de unidades ducto-lobulillares terminales.

A partir de la cuarta década de la vida, ocurre una especie de involución donde disminuyen progresivamente los Lob 3 y 2 hasta que a los 60 años aproximadamente, la histología mamaria está conformada casi exclusivamente por Lob1.

Es importante resaltar la relación que se establece entre el grado de diferenciación del tejido mamario con el desarrollo de angiogénesis y la cantidad de receptores para estrógeno y progesterona presente en los mismos, de manera que el Lob 1 es menos diferenciado, tiene más angiogénesis y mayor número de receptores esteroideos que el lob 4 (6).



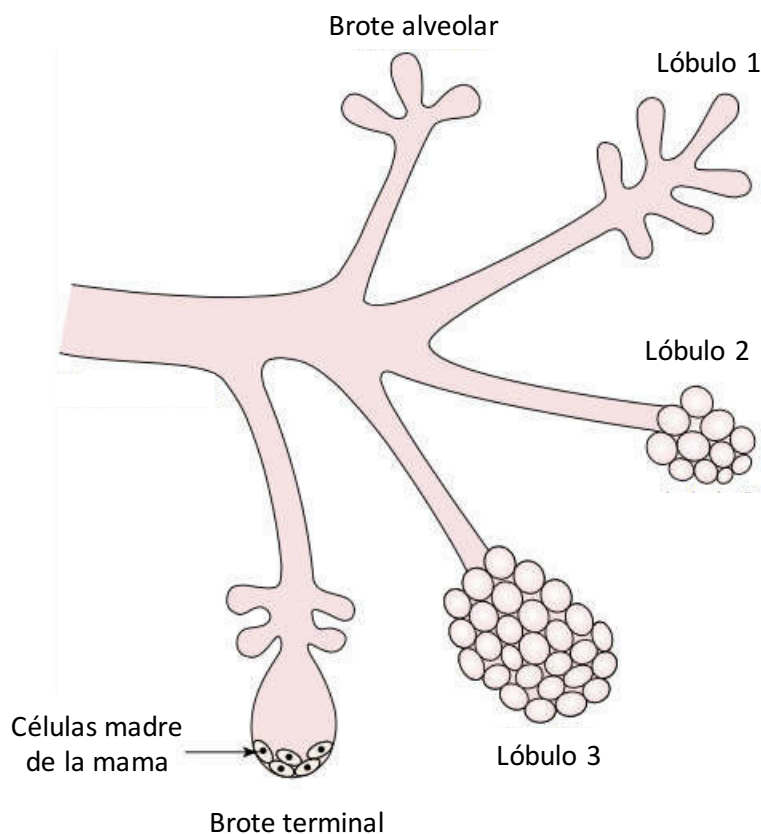


Figura 5 Desarrollo de los lóbulos de la glándula mamaria. El sistema ducto alveolar presenta diferencias histológicas en las distintas etapas del desarrollo mamario, que dan origen a la clasificación de lóbulos (Lob) mamarios en 4 tipos

## 9 RELACIÓN DEL EMBARAZO CON EL RIESGO AL DESARROLLO DE CM.

Se ha asociado el embarazo como factor que modifica el riesgo a CM en la mujer. El riesgo se ve incrementado en las mujeres cuyo primer embarazo a término es después de los 25 años y la protección contra CM es más pronunciada en las mujeres que tienen su primer embarazo antes de esta edad (6).

La glándula mamaria alcanza su desarrollo máximo durante el embarazo y la lactancia (Lob 4), después de la menopausia el tejido de la glándula mamaria

regresa al el Lob1 (Figura 5) y esto ocurre tanto en mujeres nulíparas como en las que han pasado por embarazos a término (15). Sin embargo, las mujeres que no gestaron tienen mayor riesgo de CM y esto podría deberse a que son biológicamente diferentes, haciendo que las células de las mujeres nulíparas sean más susceptibles a carcinogénesis. Se postula que las células del Lob1 en las mujeres nulíparas nunca pasaron por el proceso de diferenciación, manteniendo una alta concentración de células epiteliales que podrían ser blancos carcinogénicos, haciéndolas más susceptibles a neoplasias (15). El Lob1 contiene células madre<sup>1</sup>, las cuales son blanco para neoplasias, los embarazos a edades tempranas inducen a que estas células se diferencien a células madre <sup>2</sup>, esta diferenciación reduce significativamente la proliferación celular de la glándula mamaria, sin embargo, el epitelio de la mama aun es capaz de proliferar en respuesta a los estímulos, como un nuevo embarazo, no obstante estas células ya han sido cebadas por el primer ciclo de diferenciación por lo que son capaces de reparar el daño en el ADN de manera más eficiente que las células que no fueron diferenciadas (15) (Figura 6) .

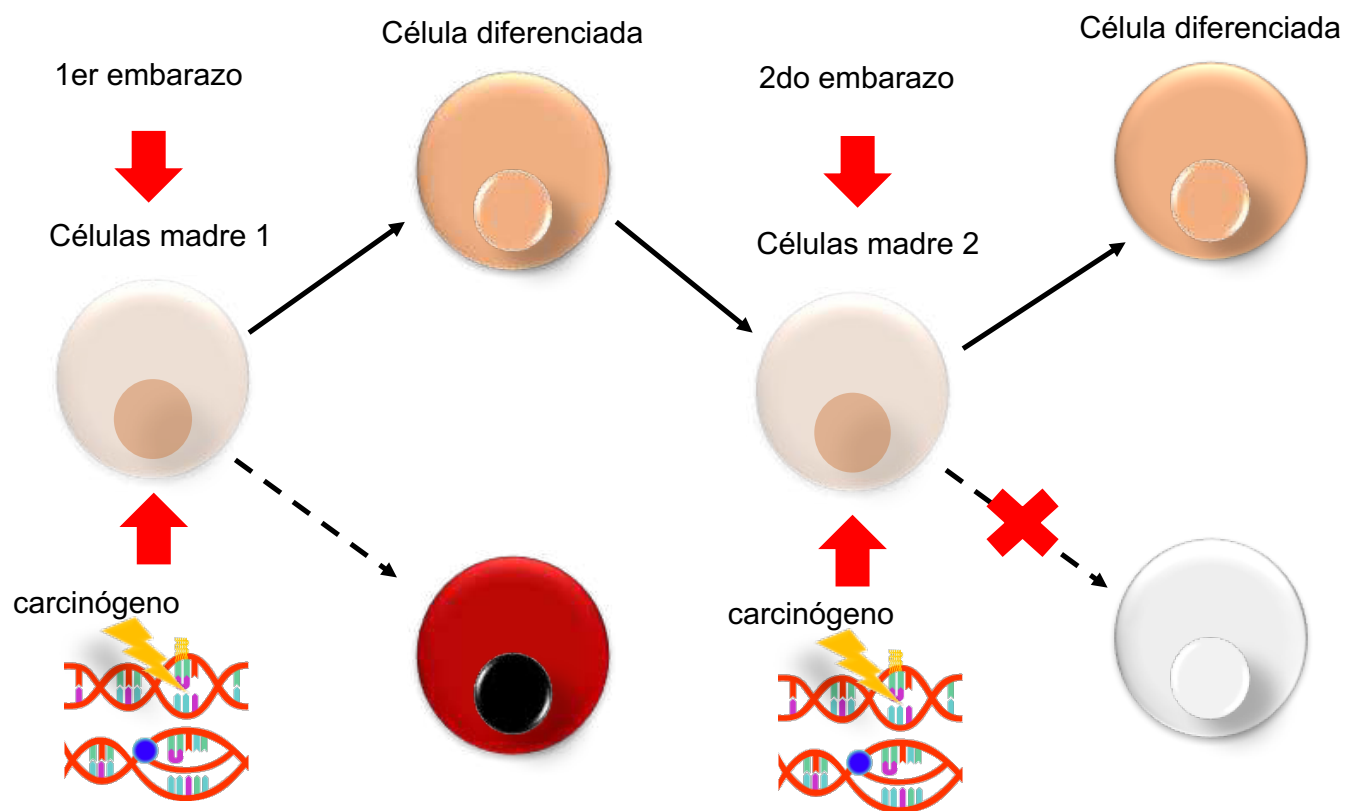


Figura 6 Diferenciación de los lóbulos de la mama, modificado de ref 15. Durante el embarazo las células de los lóbulos de la glándula mamaria se diferencian de células madre 1 a células madre 2.

## 10 EDAD DEL EMBARAZO Y EL RIESGO A CM.

Los estudios epidemiológicos han demostrado que el embarazo a término confiere un efecto protector contra el CM. Las mujeres cuya primera gesta fue antes de los 20 años tienen una disminución del 50 % a desarrollar CM con respecto a las nulíparas, sin embargo, a partir de los 25 años el riesgo se incrementa mientras que en las mujeres cuyo primer embarazo es después de los 30 años tiene un riesgo más pronunciado, además del embarazo a edades tempranas, los embarazos múltiples y la lactancia materna disminuyen el riesgo a desarrollar CM, aunque en un grado menor, en la (Figura 7) se muestra una gráfica con los efectos de la edad y el riesgo a CM. El tiempo de lactancia esta inversamente asociado con el carcinoma de mama y cada embarazo incrementa el efecto protector entre un 10 a 13 %. Los datos epidemiológicos muestran que la paridad protege contra los subtipos de estrógenos positivos (RE+) y progesterona positiva (RP+), sin embargo, no se ha encontrado que la paridad y la edad del primer embarazo proteja de los subtipos RE- y RP- (6) (Figura 8).

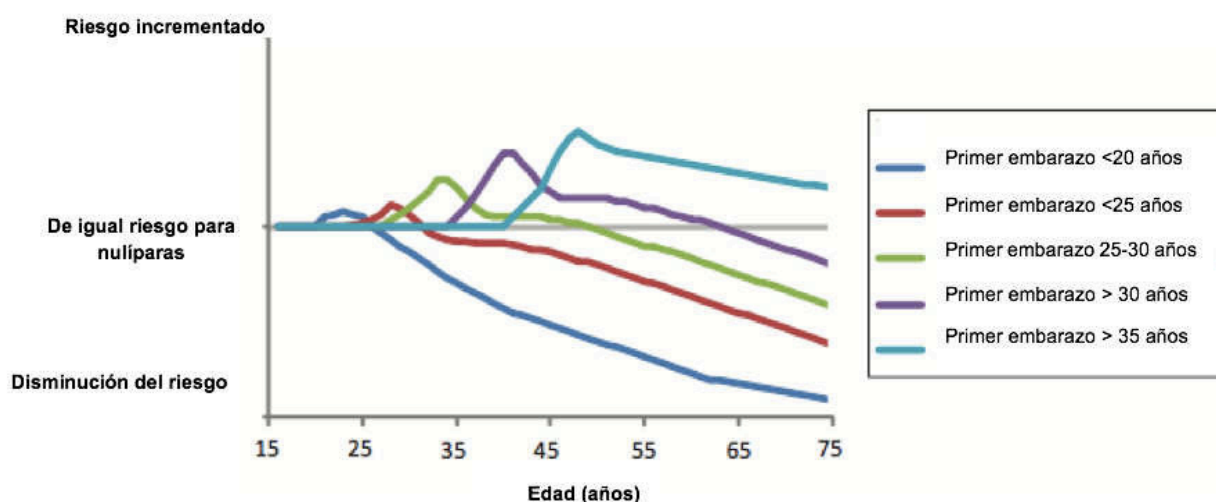


Figura 7 Edad y riesgo a desarrollar CM. Los riesgos para desarrollar CM se incrementan en mujeres nulíparas, mientras que en mujeres que tuvieron su primera gesta antes de los 25 años presentan un menor riesgo a CM. Modificado de la referencia7.

## **11 LACTANCIA MATERNA Y CM**

La lactancia confiere protección contra el CM a través de (15) la diferenciación de las células de la glándula mamaria para la producción leche, como ya fue explicado previamente en el punto 8, además durante la lactancia se inhiben algunos ciclos menstruales, lo cual se ha asociado con un efecto protector debido a que en estos periodos no existen elevaciones de los estrógenos, reduciendo la exposición a estos mitógenos. La excreción de carcinógenos a través de la leche humana ayuda a eliminar las células con ADN dañado reduciendo la susceptibilidad a mutaciones, también se sabe que la lactancia ayuda a disminuir las concentraciones séricas de insulina (16). En estudios previos se ha demostrado que las concentraciones séricas GH crónicamente elevadas, incrementan las concentraciones de IGF-I, el cual ha sido asociado con la proliferación y anti- apoptosis del tejido mamario.

Diversos estudios han identificado que el periodo prolongado de lactancia es proporcional a la disminución del riesgo de desarrollar CM (15).

## **12 FUNCIÓN DEL EJE DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO (GH) Y EL FACTOR DE CRECIMIENTO TIPO INSULÍNICO (IGF-I) EN EL DESARROLLO DE LA GLÁNDULA MAMARIA.**

La GH por medio del IGF-I, aumenta la síntesis de proteínas al mejorar la captación de aminoácidos y acelerar de manera directa la transcripción y traducción de mRNA. Esta hormona disminuye el catabolismo de proteínas movilizandolos ácidos grasos como una fuente combustible más eficiente: causa de manera directa la liberación de ácidos grasos a partir del tejido adiposo, y aumenta su conversión en aceti-CoA a partir de la cual se obtiene energía. Este efecto de ahorro de proteínas es un importante mecanismo mediante el cual la GH promueve el crecimiento y desarrollo.

La GH tiene un efecto directo sobre el IGF-1 provocando que la glándula mamaria cuadruplique su tamaño en primates. La GH y el IGF-I tienen un importante rol en el desarrollo de la glándula mamaria. El IGF-I participa en la morfogénesis ductal, se ha demostrado que en ausencia de este factor, el desarrollo del sistema ductal no se lleva a cabo aun en presencia de estrógenos. Además, este factor está involucrado en el mantenimiento de la mama durante la lactancia.

La GH y el IGF-I pueden promover el crecimiento y progresión del tumor debido a que estas hormonas están involucradas en procesos metabólicos, diferenciación y división celular.

### **13 FUNCIÓN DE LA HORMONA SOMATOMAMOTROPINA CORIÓNICA HUMANA (CSH) EN EL DESARROLLO DE LA GLÁNDULA MAMARIA**

La CSH también es conocida como lactógeno placentario (HPL), contribuye al metabolismo normal de la glucosa, así como a la movilización de ácidos grasos libres. En las mujeres embarazadas: causa una respuesta hiperinsulinémica a las cargas de glucosa, (16) parece estimular directamente la secreción de insulina de los islotes pancreáticos y contribuye a la característica de resistencia a la insulina periférica del embarazo. Las tasas de producción de esta hormona pueden alcanzar hasta 1 a 1.5 g/día, al término del embarazo (16)

### **14 FUNCIÓN DE LA PROLACTINA (PRL) EN EL DESARROLLO DE LA GLÁNDULA MAMARIA**

La prolactina está directamente implicada en la fisiología de la mama, es la principal responsable de la producción láctea, incrementa la transcripción del mRNA a nivel celular para la síntesis de las proteínas lácteas, como la caseína. Su función requiere de la acción conjunta de otras hormonas lactogénicas como la CSH. Los factores de crecimiento, como el [factor de crecimiento transformante beta](#)

(*TGF-β*) y el factor de crecimiento de fibroblastos (*FGF*), intervienen como facilitadores entre la acción mitogénica del estradiol. Otras hormonas como las tiroideas son requeridas para la adecuada función de la PRL. La galactopoyesis es

una función fundamental de la oxitocina y secundariamente de la vasopresina en respuesta al conocido reflejo neuro-hormonal eyecto lácteo (16). La PRL, fundamentalmente es producida en la adenohipófisis, pero también es sintetizada “in situ” en la glándula mamaria y secretada en la leche, en la que parece tener funciones inmunológicas. Se ha reportado secreción de PRL en quistes y tumores malignos de mama, endometrio, testículos y sistema inmune, en los que su acción queda por definir.

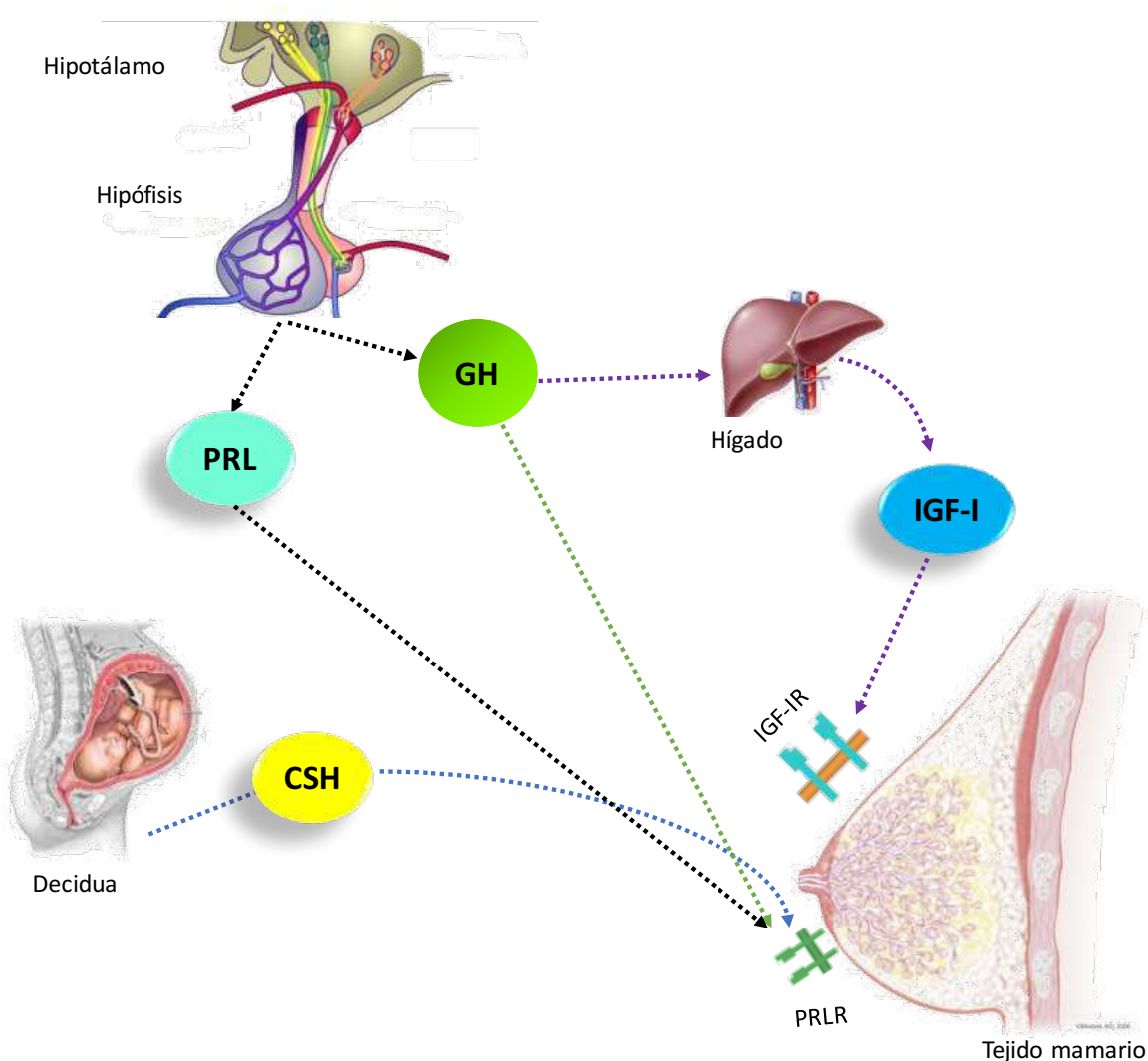


Figura 8. Interacciones de los genes GH1, IGF-I, PRL, PRLR, CSH1 en el desarrollo de la glándula mamaria (19) (20) (21).

## **CAPÍTULO II: ANTECEDENTES**

### **15 ALELOS DE RIESGO PARA CM EN LOS GENES GH1 E IGF-I.**

El eje GH-IGF-I juega un papel importante en el desarrollo de la mama ya que participa en los mecanismos de proliferación, diferenciación y apoptosis.

Diversos autores han reportado en estudios de casos y controles, que el aumento de IGF-I, sérico está asociado a un incremento en el riesgo a desarrollar cáncer de próstata y de mama, otros reportes indican que sujetos con acromegalia presentan un riesgo incrementado a desarrollar cánceres como el de colon, tiroides, próstata y mama. Se han identificado variaciones polimórficas y se ha estudiado la posible asociación de distintos SNP's de este gen con el aumento de riesgo a CM. Dentro de los SNP's estudiados, en el SNP rs2665802 (A/T) en el gen de GH se ha asociado al alelo A con un efecto protector en cáncer de colon. Wagnser et. al. (22) reportaron que el alelo A de este mismo SNP estaba asociado con un riesgo incrementado a CM en mujeres post-menopáusicas, además que se encontró asociado a un incremento en los niveles de IGF-I (21). Nayte et. al. (21) reportaron dos SNP's en el gen IGF-I rs35765 (A/T) y rs2162679 (C/T), los cuales se encuentran en una región haplotípica que fue asociada al CM.

### **16 ALELOS DE RIESGO A CM EN LOS GENES DE PRL Y PRLR**

La PRL es una hormona polipeptídica neuroendocrina que se sintetiza principalmente en las células lactotróficas del lóbulo anterior de la glándula pituitaria (adenohipófisis) y es transportada en la sangre, además esta hormona es secretada por otros órganos como la glándula mamaria, por lo que el flujo de esta hormona al tejido de la glándula mamaria es por fuentes locales y sistémicas.

Sulggi et al (16) reportaron SNP's en los genes de la PRL y PRLR que se encuentran asociados al riesgo a CM en mujeres postmenopáusicas en el gen PRLR rs249537 (A/G), rs7718468 (A/G) y rs13436213 (C/T).



Lee y cols. reportaron un SNP' en el intron1 del gen de la PRL rs2244503 (A/G), el cual asociaron con un incremento de hasta el 50 % en los niveles séricos de PRL cuando se presentaba el alelo G.

### **ALELOS DE RIESGO A CM EN LOS GENES CSH1**

Actualmente hay pocos estudios del efecto de la CSH y el riesgo a CM. Algunos autores han hipotetizado que las variaciones en el gen CSH1 que codifica para CSH (también conocida como lactógeno placentario) pueden estar influyendo en el riesgo a CM en mujeres que han tenido hijos, esto puede ser debido a que esta hormona está involucrada en la capacidad lactogénica, un factor que se ha descrito como protector. Existen pocos SNP's que hayan sido validados y reportados para este gen. Yu Chen y cols (17) reporta el SNP rs2955245 (G/A) en la región promotora de este gen, este SNP no ha sido asociado previamente al riesgo de CM.

## JUSTIFICACIÓN

La etiología del CM es muy compleja, sin embargo, se han identificado factores que incrementan el riesgo a desarrollar esta patología (ambientales, reproductivos y genéticos).

El CM esporádico se presenta en el 90 al 95% de los casos, no está asociado a mutaciones en genes de alta penetrancia como: BRCA1 y BRCA2, por lo que se ha planteado que la suma de variantes en genes de baja penetrancia generan susceptibilidad. Debido a que los polimorfismos en genes de baja penetrancia son muy frecuentes en la población, estos podrían explicar el 22% de los casos de CM que no presentan mutaciones en los genes de alta penetrancia.

En México el CM es un grave problema de salud pública que se incrementa cada año, por lo que es importante identificar polimorfismos en genes asociados a esta enfermedad en mujeres mexicanas. El estudio de estos polimorfismos nos permitirá identificar variaciones genéticas o “firmas moleculares” para evaluar el riesgo de CM y apoyar al área clínica con miras a sustentar una medicina preventiva personalizada.

## **HIPÓTESIS.**

Los polimorfismos en los genes de PRL, PRLR, CSH y el eje GH-IGF-I, aumentan el riesgo o tienen un efecto protector para el desarrollo de cáncer de mama en mujeres del noreste de México.

## **OBJETIVO GENERAL**

Identificar polimorfismos en genes involucrados en el embarazo, la lactancia y el eje GH- IGF-I asociados al desarrollo del cáncer de mama en mujeres del noreste de México.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1.- Identificar factores de riesgo clínicos y epidemiológicos en pacientes del noreste de México con CM.
- 2.- Identificar la frecuencia de polimorfismos en los genes GH1, CSH, IGF-I, PRL y PRLR e identificar su relación con el riesgo a protección al desarrollo de CM.
- 3.- Identificar nuevos polimorfismos en la región promotora del gen GH1 en mujeres mexicanas.

## **ESTRATEGIA GENERAL.**

Este estudio fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de Medicina de la UANL, con la clave BI10-002. Se invitaron a participar pacientes con CM diagnosticado y mujeres sanas con mamografía negativa para esta enfermedad, cada una de las participantes leyeron y firmaron la carta de consentimiento informado y se registraron datos antropométricos, antecedentes reproductivos, antecedentes heredofamiliares y demográficos además para las pacientes se tomaron datos patológicos como: lado del tumor, subtipo molecular, tratamiento, entre otros.

A cada una de las participantes se les tomó una muestra de sangre venosa periférica en un tubo con anticoagulante (EDTA) y se realizó la extracción de ADN genómico.

Para la genotipificación de los SNP's en los genes GH1, CSH, IGF-I, PRL y PRLR se utilizó la metodología PCR tiempo real. Para la búsqueda de nuevos polimorfismos en el gen de la GH se utilizó la secuenciación Sanger.

Los datos se analizaron con el programa estadístico SPSS.

En la Figura 9 se esquematiza la estrategia general que se llevó a cabo.

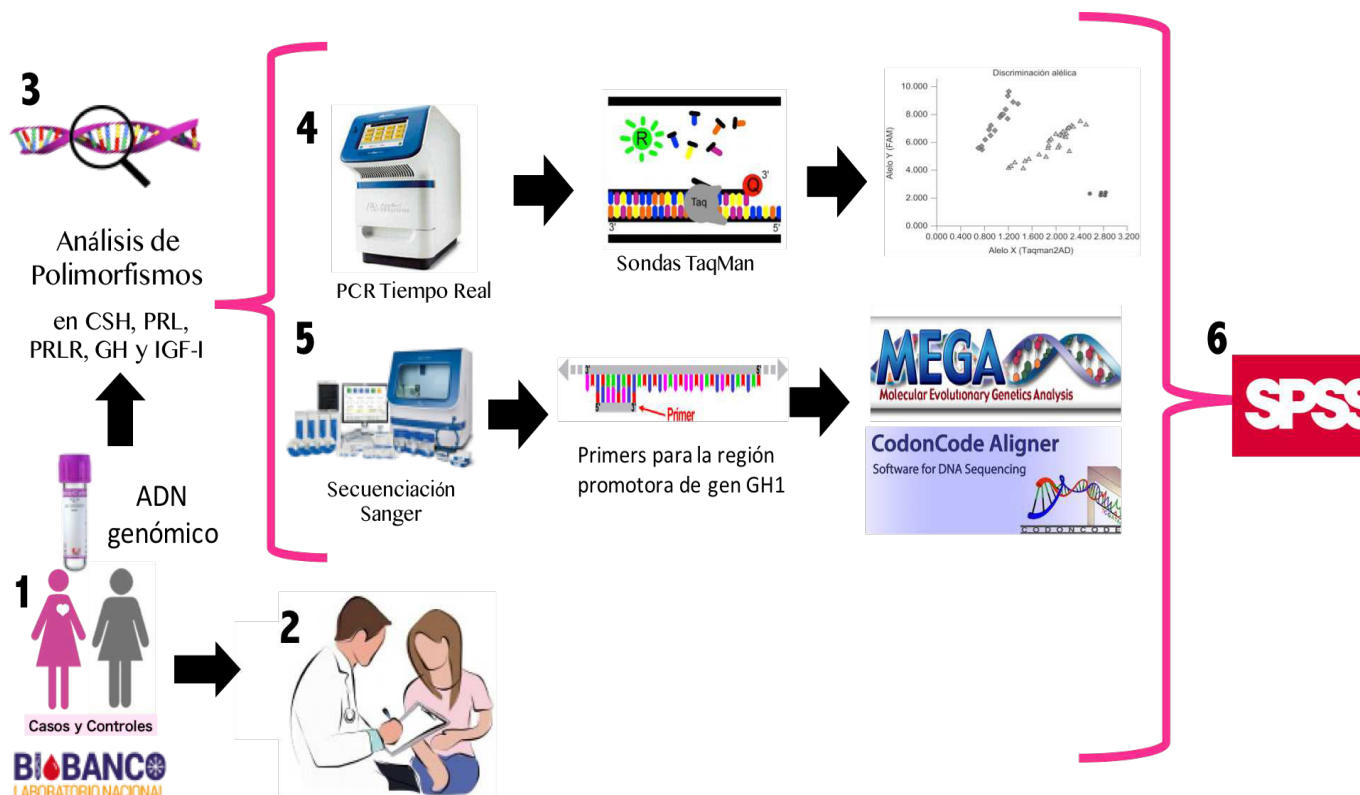


Figura 9 Estrategia General. (1 y 2) Se reclutaron pacientes con CM y controles, (3) se realizaron extracciones de ADN y (4 y 5) los polimorfismos fueron detectados por PCR en tiempo real y secuenciación Sanger.

## **CAPÍTULO III: MATERIAL Y MÉTODOS**

### **17 DISEÑO DEL ESTUDIO.**

La presente investigación fue diseñada como un estudio de casos y controles transversal y observacional.

### **18 LUGAR DE REALIZACIÓN DEL ESTUDIO.**

El desarrollo experimental del proyecto tuvo como sede:

- El laboratorio de Genómica y Bioinformática del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.
- El Laboratorio Nacional BIOBANCO del CONACyT.

Las instituciones participantes en este proyecto para la obtención de muestras fueron:

- El Centro Universitario contra el Cáncer del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la UANL.

### **19 POBLACIÓN ESTUDIADA.**

El protocolo fue sometido y aprobado por el Comité de Ética de la Subdirección de Investigación de la Facultad de Medicina, con el número de registro BI10-002.

Para este estudio se recolectaron muestras de sangre periférica de casos y controles, a continuación, se describen los dos grupos: Grupo 1) Pacientes diagnosticadas con CM que estuvieran recibiendo su tratamiento en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” o en la Clínica de especialidades número 25 del IMSS. Grupo 2) Mujeres sin diagnóstico de CM con mamografía o ecografía negativa para CM. A cada mujer se le invito a participar en el estudio, se le dio información detallada oral y escrita acerca del protocolo y se respondieron todas sus dudas, si accedían a participar, tanto las pacientes como las voluntarias firmaron la carta de Consentimiento Informado y se procedió a la toma de

muestras de sangre venosa periférica. A cada participante se le tomaron 3 mL de sangre venosa en tubos con EDTA y 3 mL en tubos sin anticoagulante. Las muestras fueron transportadas al Laboratorio Nacional Biobanco, fraccionándolas en alícuotas con el fin de generar un almacén de bioespecímenes de las pacientes del estudio. A la vez se generó un archivo electrónico en el programa SPSS con los datos relevantes de cada paciente y voluntaria.

## **20 VARIABLES DE ESTUDIO.**

Para cada uno de los participantes de este estudio se recolectaron los siguientes datos: (1) Edad (2) Características demográficas, (Lugar de nacimiento), (3) Características antropométricas: (Talla, peso, Índice de Masa Corporal), (4) Características clínico-patológicas de los casos (lado del CM, tipo histológico del cáncer y estado de los receptores hormonales, (5) Información adicional (consumo de anticonceptivos orales y/o uso de terapia hormonal, consumo de alcohol, tabaco y drogas).



## 21 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN.

En la tabla 2 se describe los criterios de inclusión y de exclusión para los casos y controles.

Tabla 2. Criterios de inclusión y de exclusión para los casos y controles

	Inclusión	Exclusión
<b>Casos</b>	Mujeres >18 años con diagnóstico confirmado de CM por patología.	Mujeres < 18 años Embarazadas
<b>Controles</b>	Mujeres > 18 años que se les haya realizado una mamografía en el último año y cuyo resultado haya sido negativo a CM, y no hayan padecido ningún otro tipo de cáncer.	VIH (+) VHC (+) Antecedentes familiares de CM

## 22 PROCEDIMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

De las muestras de pacientes y controles se separó el suero y el plasma en un tiempo máximo de 3 horas después de la toma, mismos que se almacenaron a -80°C en el Biobanco. Cada muestra fue codificada y las alícuotas se etiquetaron con la clave de la muestra.

Para realizar la extracción de ADN genómico de las muestras de sangre se siguió el siguiente protocolo:

Se combinaron 500 µl de la sangre, plasma o suero en un microtubo de 2 ml con 200 µl de buffer de lisis TSNT (Triton X100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris HCl pH 8 10mM, EDTA pH8 1mM.) y se mezclaron por inversión o en vórtex a velocidad baja o media durante 30 segundos. Se añadieron 500 µl de fenol saturado y se mezcló por inversión o en vórtex a velocidad baja o media durante 1 a 3 minutos.

Se agregaron 100 µl de Sevag y se mezclaron en vórtex a velocidad baja o media durante 3 a 5 minutos. Se agregaron 150 µl de TE 1X (EDTA 100mM y Tris HCl 1M:) y se mezclaron por inversión o en vórtex a velocidad media o baja durante 1 minuto. Las muestras se centrifugaron por 8 minutos a 10,000 rpm para después transferir la fase acuosa a un microtubo de 1.5 ml. Se volvieron a extraer las muestras a partir de la fase acuosa, agregando 100 µl de Sevag mezclando en vortex de 3 a 5 minutos.

Se agregaron 150 µl de TE 1X y se mezclaron por inversión y/o en vortex durante 1 minuto. Se centrifugaron las muestras durante 8 minutos a 10,000 rpm y se transfirió la fase acuosa a un micro tubo de 1.5 ml. Después se agregaron 2.5 volúmenes de isopropanol y se mezclaron gentilmente por inversión. Se dejó reposar 1 hora a bajas temperaturas (-20 o -70°C). Se centrifugó 15 min. a 14 000 rpm, se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla agregando 500 µl de etanol al 70%. Se centrifugó 15 min a 14 000 rpm y se dejó secar la pastilla de ADN a temperatura ambiente durante 20 min. Por último, se resuspendió la pastilla con la pipeta agregando 150µl de TE 1X.

Posteriormente se cuantificaron las muestras de pacientes y controles en el espectrofotómetro Nanodrop 2000, las cuales debían cumplir con los parámetros de calidad requeridos: tener una relación 260/280 igual o mayor relación 260/280 igual o mayor a 0.7. Al cumplir con estos parámetros, se prepararon las diluciones de trabajo a una concentración final de ADNg de 20ng/µl

## **23 PRUEBA PILOTO**

Para llevar a cabo el cálculo del tamaño de muestra para cada SNP, se realizó una prueba piloto en la que se incluyeron 95 personas al azar, a las cuales se les genotipificaron los SNPs a analizar por la técnica por PCR-tiempo real. Esto se llevó a cabo con la finalidad de conocer la frecuencia de los polimorfismos en la población general, dato que era necesario para inferir al tamaño de muestra que permitiera llevar a cabo un estudio de asociación entre variantes genéticas y el desarrollo de cierta enfermedad, en nuestro caso el CM.

En base a los resultados y con la ayuda del programa estadístico Quanto, el cual considera las variables genéticas de la enfermedad, se lleva a cabo el cálculo de la N, dando como resultado una N distinta para cada SNP. Por lo tanto, se toma la N más alta y con este parámetro se fija la N requerida para los 8 SNP que se estudiarán en este trabajo de

## **24 ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS**

A todas las muestras incluidas en este estudio, tanto pacientes como controles se les realizó la genotipificación de SNP's en los genes de GH1, CSH1, IGF-I, PRL y PRLR. Se utilizaron sondas TaqMan® Pre- Diseñadas SNP Genotyping Assay las cuales se encuentran disponibles comercialmente en Thermo Fisher (Applied Biosystems) en la Tabla 3 se muestran los numero de identificación así como la localización de estos en el genoma , en la Tabla 4 se muestran las condiciones de reacción para los SNP' estudiados en este trabajo.

Tabla 3 Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP)

Gen	Polimorfismo	Localización	ID	Catalogo
<b>GH1</b>	<b>rs2665802</b>	Intron 4	C__11628130_10	<b>4351379</b>
<b>IGF-I</b>	rs35765	Promotor	C____799148_10	<b>4351379</b>
	rs2162679	Intron 1	C__16084878_10	<b>4351379</b>
<b>CSH1</b>	rs2955245	Promotor	C__27266006_10	<b>4351379</b>
<b>PRL</b>	rs9466314	Región 5'	C__30301613_10	<b>4351379</b>
	rs2244502	Intron 3	C__16283940_10	<b>4351379</b>
<b>PRLR</b>	rs34024951	Intron 3	C__11281126_10	<b>4351379</b>
	rs13436213	Intron 3	C__31636168_10	<b>4351379</b>

Tabla 4 Condiciones de genotipificación por PCR-Tiempo Real

Reactivo	Concentración requerida	Volumen
<b>TaqMan Universal Master Mix II 20X</b>	1X	5µl
<b>Sonda TaqMan Genotyping Assays 20X</b>	1X	0.5 µl
<b>ADN</b>	50 ng/µl	2 µl
<b>ADN libre de nucleasas</b>	-	2µl

Se utilizó el software del equipo StepOnePlus (de la casa comercial Applied Biosystems), bajo las condiciones establecidas en la tabla 4 para detectar mujeres homocigotas para la presencia del alelo normal, heterocigotas y homocigotas para la presencia del alelo variante. La discriminación entre estos grupos es posible debido a que la reacción de PCR se lleva a cabo en presencia de sondas marcadas con fluoróforos (Figura 10).

Alelo 1.- Fluorocromo FAM™ unido al extremo 5' de la sonda del alelo 1 (alelo normal)

Alelo 2.-Fluorocromo VIC® unido al extremo 5' de la sonda del alelo 2 (alelo variante)

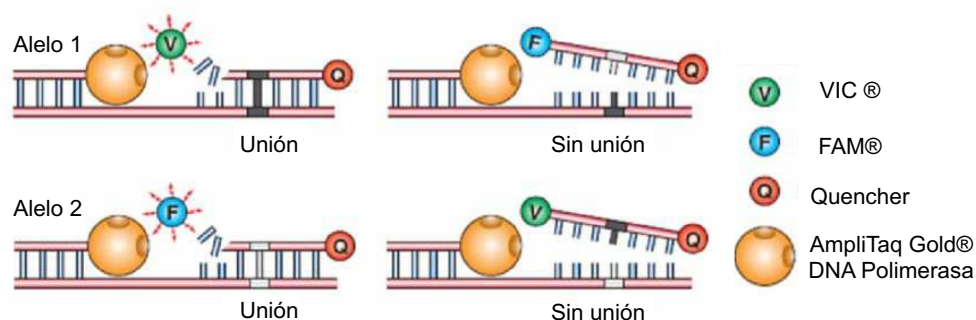


Figura 10 Sondas TaqMan. Las sondas TaqMan son sondas de hidrólisis diseñadas para incrementar la especificidad de la qPCR.

La reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar el ADN de las células y de degradar la sonda marcada, cuando la sonda se degrada, se libera fluorescencia ya sea de la sonda para el alelo normal o la de la variante. La fluorescencia es detectada por el equipo mientras que el software agrupa a los pacientes según la fluorescencia que emiten, ya sea por un solo fluorocromo indicando homocigocidad o ambos indicando que la muestra es heterocigoto para el SNP.

## 25 AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN PROMOTORA DE GH1

Para la búsqueda de nuevos polimorfismos se utilizó el ADN de 21 muestras de pacientes y 9 controles. Se procedió a amplificar la región promotora del gen GH1, sitio que regula y controla la expresión del gen (Figura 11). Se utilizaron oligonucleótidos pre-diseñados de Termofisher® (Hs00349128\_CE) que amplifican la región promotora del gen, el exón 1 y el intrón 1 (Figura 11). La secuencia de los oligonucleótidos se muestra en la Tabla 5, la mezcla de reactivos se muestra en la Tabla 6 y el programa de temperaturas utilizado se muestra en la Tabla 7, el tamaño del fragmento amplificado fue de 500 pb.

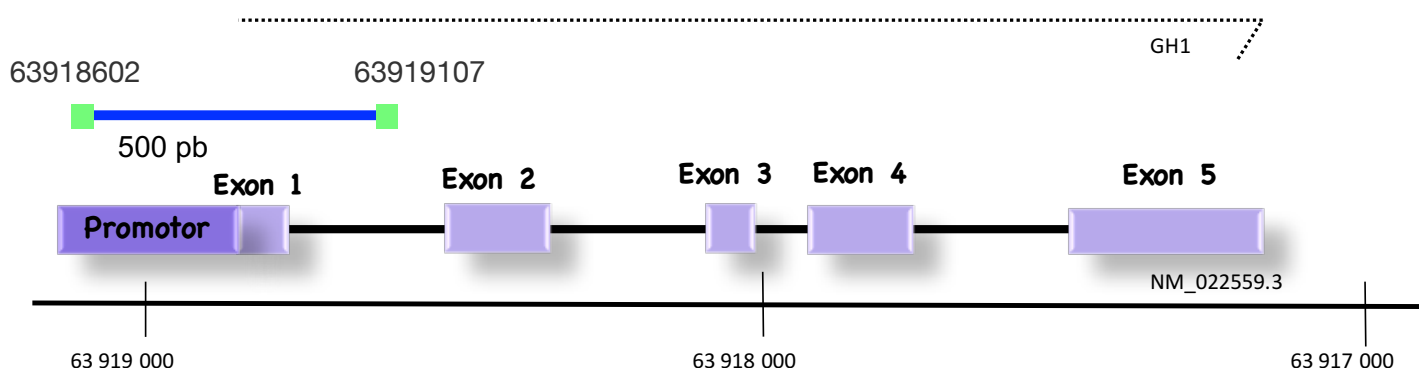


Figura 11 Región promotora del gen GH1

Tabla 5 Oligonucleótidos para la región promotora de GH1

<b>500 pb</b>	<b>Hs00349128_CE</b>
<b>(FWD) 5'-3'</b>	<b>-TCC AGG GAC CAG GAG CTT TCT</b>
<b>(REV) 5'-3'</b>	<b>-GCA CCC ACG TGA CCC TTA AAG AG</b>

Tabla 6 Concentraciones de reactivos para amplificación de la región promotora del gen GH1

<b>Reactivos</b>	<b>Concentración Inicial</b>	<b>Concentración Final</b>	<b>µL</b>
<b>GoTaq</b>	<b>10 X</b>	<b>1X</b>	<b>12.5</b>
<b>FWD</b>	<b>50 uM</b>	<b>1 uM</b>	<b>0.5</b>
<b>REV</b>	<b>50 uM</b>	<b>1 uM</b>	<b>0.5</b>
<b>Agua</b>	<b>-----</b>	<b>-----</b>	<b>9.5</b>
<b>DNA</b>	<b>-----</b>	<b>100 ng</b>	<b>2</b>
<b>Vol de rxn</b>	<b>-----</b>	<b>-----</b>	<b>25</b>

Tabla 7 Programa de temperaturas para la amplificación de la región promotora de GH1

<b>Paso</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo ( minutos )</b>
<b>1</b>	<b>95</b>	<b>12</b>
<b>1</b> <b>30 ciclos</b>	<b>95</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>55</b>	<b>1</b>
<b>3</b>	<b>72</b>	<b>1</b>
<b>Terminación</b>	<b>4</b>	

## 26 ELECTROFORESIS AMPLIFICACIÓN DE LA REGION PROMOTORA GH1

Para la visualización del producto amplificado de la región promotora del gen GH1 se realizó electroforesis en un gel de agarosa al 2% en solución amortiguadora TAE 1X. El gel fue teñido con bromuro de etidio y se utilizó el marcador 100 pb, se colocaron 7  $\mu$ L del producto amplificado con 3  $\mu$ L de jugo azul y se corrió a 100 volts por 1 hora. El gel fue examinado bajo luz UV.

## 27 PURIFICACIÓN DEL TEMPLADO

Los productos de PCR se purifican con ExoSAP-IT de Affimetrix (Exonucleasa y Fosfatasa alcalina en Buffer) donde la exonucleasa I degrada los residuos de los primers de cadena sencilla residuales y cualquier cadena sencilla de ADN extraña producida por la PCR, mientras que la fosfatasa alcalina hidroliza los dNTPs no consumidos y los primers que pudieran haber quedado dentro de la reacción y que pudiera intervenir con el proceso de secuenciación, las condiciones de uso se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8 Purificación de la muestra con ExoSap

+	<b>Se toman 7 <math>\mu</math>l del producto amplificado pro PCR</b>
	ExoSAP-IT 3 $\mu$ l
<b>Incubar a 37°C por 30 minutos</b>	
<b>Incubar a 80°C por 10 minutos</b>	



## 28 CUANTIFICACIÓN DE ADN EXTRAÍDO

Posterior a la purificación de los ácidos nucleicos fueron cuantificados en Nanodrop utilizando agua libre de nucleasas como blanco y leyendo la absorbancia a 260 y 280 nm.

## 29 CICLO DE SECUENCIACIÓN

La reacción de secuenciación se llevó a cabo utilizando el reactivo BigDye Terminator v3.1 Sequencing kit de Life Technologies. El producto de PCR purificado se dividió en 2 alícuotas y a cada una se le añadió 1µl del primer correspondiente, 3µl de agua MiliQ y 1 µl de BigDye Terminator a esta reacción se le realizó una PCR bajo las condiciones mostradas en la Tabla 9.

Tabla 9 Condiciones para ciclo de secuenciación de la región promotora de GH1

	Temperatura °C	Tiempo
<b>Desnaturalización</b>	96	1 min
<b>Alineamiento</b>	96	10 seg
<b>25 ciclos</b>		
	50	5 seg
<b>3</b>	60	4 minutos
<b>Terminación</b>	4	Hasta la purificación

### 30 PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR DE SECUENCIACIÓN.

Los productos fueron purificados con Big Dye Xterminator, el cual esta diseñado para aislar los componentes del ciclo de secuenciación como sales, los nucleótidos fluoroforos no incorporados y los dNTPs para prevenir su coinyección al equipo con los productos marcados con fluoroforos. El reactivo se añade directamente a la reacción de secuenciación y se mezcla por agitación mecánica. Durante la agitación, los reactivos del BigDye X Terminator, capturan e inmovilizan los componentes no deseados. Posterior a esto se centrifuga para remover la fracción insoluble de la mezcla de reacción. en la Tabla 10 se muestra la función detallada de X-Terminator y del SAM Solution

Tabla 10 BigDye Xterminator Purification kit

<b>X Terminator</b>	<b>Captura los terminadores marcados y sales libres posteriores a la reacción del ciclo de secuenciación</b>
<b>SAM Solution</b>	Mejora el rendimiento del reactivo BigDye Xterminator y estabiliza la muestra después de la purificación

La purificación con el BigDye se llevó a cabo añadiendo a cada reacción posterior al ciclo de secuenciación, 45µl de la solución SAM agitándola a su máxima velocidad sin permitir la sedimentación mayor a 2 minutos

Posteriormente se añadió la solución Xterminator mezclado previamente por agitación mecánica por 10 segundos hasta homogenizar. Finalmente se añadieron 10 µl de esta solución a cada reacción.

Para realizar la lectura de las muestras se cubrieron las reacciones films adhesivos (MicroAmp Clear Adhesive Films) y se agitaron por 30 minutos, finalmente se centrifugaron y secuenciaron en el equipo ABI PRISM® 3500 Genetic Abalyzer.

### **31 ENSAMBLE DE SECUENCIAS**

Se obtuvo la información en crudo de las secuencias en archivos individuales con extensión \*.ab1. Este archivo contiene el electroferograma de la muestra secuenciada. Se obtuvieron 2 archivos para cada una de las muestras. Las secuencias fueron ensambladas y curadas manualmente verificando los electroferogramas.

### **32 ANÁLISIS DE SECUENCIAS**

### **33 ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS**

Una vez obtenidas las secuencias se realizó alineamiento múltiple de las secuencias empleando el programa MEGA 6.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) y utilizando como módulo de ClustalW en el Explorador de Alineamiento. Se verificaron los cambios en los nucleótidos y validaron los cambios en la secuencia. Las secuencias fueron re-analizadas con el programa codón code aligner.

### **34 IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS SNP'S**

Se localizaron los SNP's entre las posiciones 63918602- 63919107 en el genoma 38 utilizando las bases de datos de Ensembl, NCBI y Genome Browser. Se localizó la posición en el genoma para posteriormente compararlo con nuestras secuencias.

## **CAPÍTULO IV: RESULTADOS**

### **35 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, PATOLÓGICAS Y EPIDEMIOLÓGICAS DE LA POBLACIÓN EN ESTUDIO.**

Para el análisis epidemiológico de la población se analizaron un total de 1200 muestras, de las cuales 650 fueron casos y 550 controles y para la genotipificación se incluyeron 307 casos y 328 controles. Estas muestras correspondían al total de las muestras recabadas en la base de datos del Biobanco. En ambos grupos se analizaron las características clínicas y epidemiológicas. La edad de los casos (pacientes) estuvo en un rango de 20 a 90 años con una media 53 años, mientras que las mujeres del grupo control estuvieron en un rango de 18 a 86 años con una media de 47 años (Tabla 9). La procedencia tanto de los casos como los controles fue de los estados de Nuevo León, Coahuila, Durango, San Luis Potosí, Chiapas y Tamaulipas en la Tabla 11 se muestra la frecuencia de la procedencia de la población estudiada.

Tabla 11 Lugar de Nacimiento, Rango de edad y Edad promedio

		<b>Casos.</b>	<b>Controles.</b>
<b>Estado de Nacimiento</b>	Coahuila	4.6%	7.6 %
	Chiapas	15%	5.2%
	Durango	1.7%	3.4%
	<b>Nuevo León</b>	<b>49.2%</b>	<b>48.2%</b>
	San Luis Potosí	6.7%	11.2%
	Tamaulipas	7.9%	8.6%
	Otros	14.9 %	15.8 %
<b>Rango de Edad</b>	< 40	13.1%	23%
	40-50	29.5%	34.8%
	51-60	28.9%	21%
	61-70	18.6%	13%
	>71	5.4%	8.2%
<b>Edad</b> — x		53	47

En la Tabla 12 se muestra el estado nutricional de nuestros casos y controles, identificamos que el 42% de los casos y 31 % de los controles presentaban obesidad, siendo estos datos estadísticamente significativos (<0.05).

Tabla 12 Nivel nutricional de los grupos caso-control

	<b>Casos</b>	<b>Controles</b>	<b>p</b>
<b>Desnutrición</b>	6(1.0%)	6 (1.3%)	.000114
<b>Normal</b>	133 (22.0%)	152 (32.1%)	
<b>Sobre-peso</b>	209(34.5%)	175(36.9%)	
<b>Obeso tipo I</b>	158 (26.1%)	98 (20.7%)	
<b>Obeso tipo II</b>	73 (12.1%)	31(6.5%)	
<b>Obeso tipo III</b>	26 (4.3%)	12(2.5%)	

En la Tabla 13 se muestran los factores de riesgo de consumo de alcohol y de tabaco en nuestros grupos de estudio. Se encontró que eran estadísticamente significativos ( $<0.05$ ) presentándose la mayor incidencia en el grupo control.

Tabla 13 Consumo de alcohol y tabaco

<b>Factores de Riesgo</b>	<b>Frecuencia (%)</b>		<b>p</b>
	<b>Casos</b>	<b>Controles</b>	
<b>Alcohol</b>	11.2	13.3	0.044
<b>Tabaco</b>	18.2	20.3	0.043

### 36 FACTORES REPRODUCTIVOS.

Las edades medias de la menarquia fueron 13 años (Tabla 14) y fueron estadísticamente iguales ( $p=.519$ ). La edad media de la menopausia fue de 45 años en ambos grupos ( $p=.287$ ). El 61 % de los casos y 39.8 % de los controles ya había presentado la menopausia.

Tabla 14 Edad de la menarquia y menopausia

Edad.	Casos	Controles	p
<b>Menarquia.</b>	13	13	.519
<b>Menopausia.</b>	45	45	.287
<b>Frecuencia. (%)</b>	61.4	39.8	

El uso prolongado de anticonceptivos orales y la terapia de reemplazo hormonal ha sido previamente reportados como un factor predisponente al CM, en este estudio los casos presentaron una mayor frecuencia (28%) de uso de anticonceptivos orales. Por el contrario, se observó el uso de terapia de reemplazo hormonal fue más frecuente en los controles (9.1%) en la Tabla 15 se muestran las frecuencias de uso de anticonceptivos.

Tabla 15 Uso de anticonceptivos orales y reemplazo hormonal

	Frecuencia %		p
	Casos	Controles	
<b>Anticonceptivos orales</b>	28.1	22.7	0.034
<b>Reemplazo hormonal</b>	8.4	9.1	.530

Observamos que en los grupos de casos y controles, la edad media a la cual nació su primer hijo fue igual (23 años) (Tabla 16) sin embargo en el grupo de casos, un porcentaje mayor de mujeres tuvo su primer hijo después de los 30 años (74%) lo cual muestra que los embarazos antes de los 30 años pueden conferir un efecto protector para CM (Tabla 15). El 66% de los casos y el 55 % d los controles lactaron en promedio 16.79 y 13.99 meses respectivamente, sin embargo, no se encontró significancia estadística ( $p= 0.101$ ).

Tabla 16 Factores reproductivos

	<b>Casos</b>	<b>Controles</b>	<b>p</b>
<b>Paridad (%)</b>	83.9	82.1	
<b>Media de la edad a la que se tuvo el 1er hijo</b>	23	22	0.010
<b>1er embarazo después de 30 años (%)</b>	12.9	9.4	0.05
<b>Lactancia (%)</b>	66	55.7	
<b>Promedio de la duración de la Lactancia (meses)</b>	16.79	13.99	0.101



### 37 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DEL GRUPO DE CASOS

En las mujeres con CM el tumor se encontró principalmente en el seno lado izquierdo (50%) y el 20.2 % de las pacientes presento metástasis, la metástasis más frecuente fue la de hueso (32%) (Figura 12 y 13) (Tabla 17). El tipo histológico más frecuente fue el adenocarcinoma ductal infiltrante en el estadio IIIA

Tabla 17 Ubicación del tumor y metástasis. El lado de presencia del tumor más frecuente fue el izquierdo.

		Frecuencia (%)
<b>Lado del cáncer</b>	Derecho	44.8
	Izquierdo	48
	Bilateral	2.4
<b>Metástasis</b>	Si	20.2
	No	60.3
	Perdidos	19.5

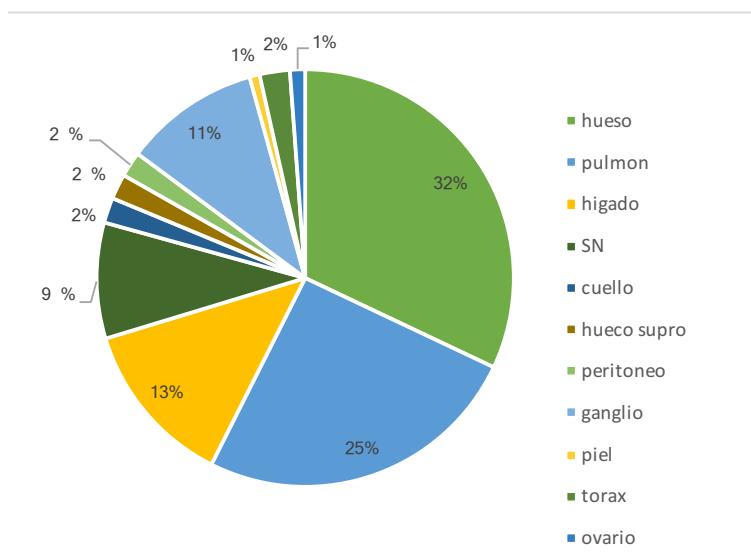


Figura 12 Sitio de la metástasis. El sitio en donde se presentó más metástasis fue el hueso.

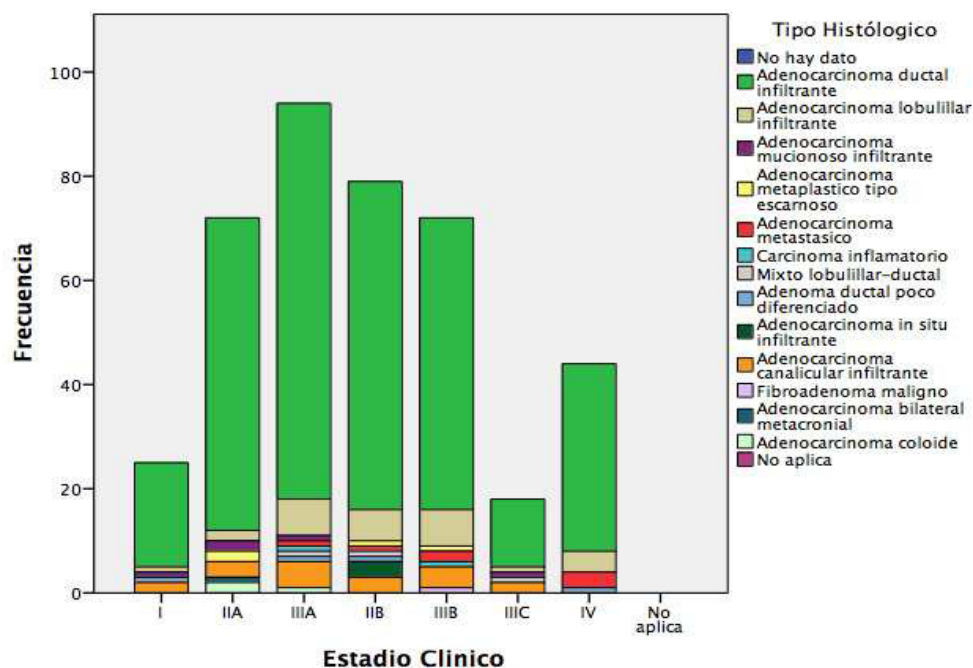


Figura 13 Tipo histológico de CM y estadio clínico. El tipo histológico más frecuente fue el IIIA.

En la Tabla 18 se muestran las frecuencias de los tipos histológicos, identificamos que el 30 % eran pacientes con CM triple negativo.

Tabla 18 Marcadores inmuno-histoquimicos. El cáncer de mama triple negativo tuvo una frecuencia del 30%.

	Frecuencia (%)			
	RE	RP	Her2	Triple negativo
Positivo	34.3	28.3	24.8	30
Negativo	24.9	28.3	32.4	

### 38 GENOTIPIFICACIÓN POR PCR TIEMPO REAL

La genotipificación de los polimorfismos se llevó a cabo con la metodología TaqMan® Pre-Diseñados SNP Genotyping Assays. La detección de los genotipos se realizó utilizando el software Stepone V2.1 el cual permite detectar los genotipos homocigotos y heterocigotos para el alelo ancestro y la variante (Figura 14). La discriminación alélica se llevó a cabo mediante el uso de sondas marcadas con un fluoróforo el alelo ancestro está marcado con VIC y el alelo variante con FAM al llevarse a cabo la reacción de PRC estos liberan la fluorescencia que es detectada por el equipo.

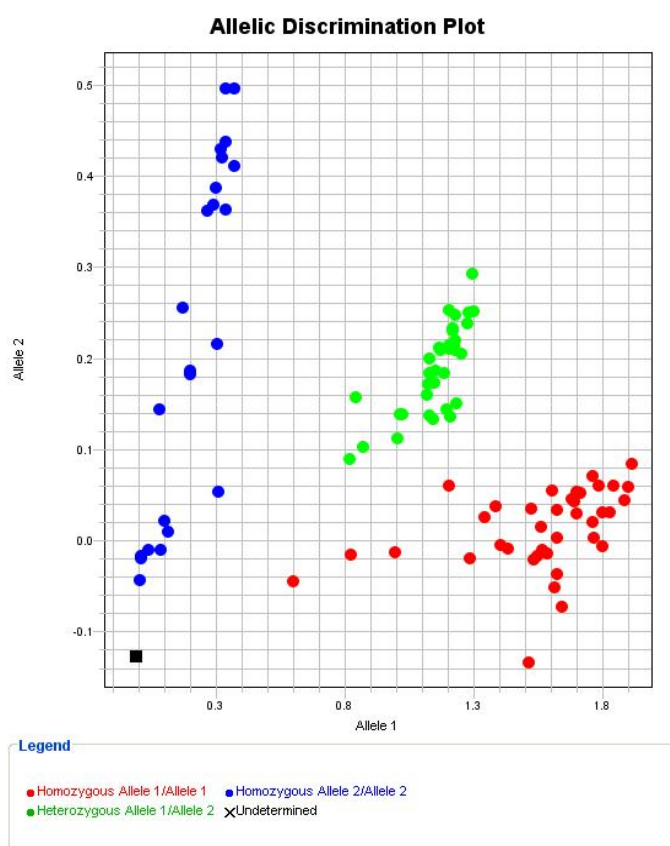


Figura 14 Grafica de discriminación alélica. En rojo se observan los homocigotos del alelo 1, en verde los heterocigotos y en azul los homocigotos para el alelo 2.

### 39 PRUEBA PILOTO

Previo a el análisis de los polimorfismos se realizó un ensayo piloto para identificar el tamaño mínimo de la muestra para cada uno de los SNP's. Se genotipificaron 95 personas mexicanas de una población abierta para obtener la frecuencia alélica de cada uno de los SNP y se además se tomaron los datos de la frecuencia mínima alélica (MAF) de la base de datos del proyecto de los 1000 genomas (1000G) resultados obtenidos fueron los siguientes (Tabla 19).

Tabla 19 Prueba piloto. Se muestran los alelos y la mínima frecuencia alélica (MAF) de cada polimorfismo.

Gen	SNP	Alelo Ancestral	MAF**	N	MAF*	N
GH	rs2665802	A	T: 0.391	260	0.36	264
	rs35765	G	T: 0.086	636	0.097	576
IGF-I	rs2162679	C	C: 0.258	294	0.29	280
	rs2955245	C	T: 0.352	264	0.34	266
PRL	rs9466314	A	T: 0.008	5966	0.003	15778
	rs2244502	A	A: 0.297	278	0.33	268
PRLR	rs34024951	A	T: 0.062	846	0.078	692
	rs13436213	C	T: 0.312	274	0.27	288

\*\*MAF =1000G MAF\*población al azar reclutada para este proyecto.

Las frecuencias alélicas obtenidas del grupo piloto se analizaron con el programa Quanto y Epitools epidemiological calculators Ausvet, el cual considera las variables genéticas de la enfermedad para calcular la N mínima para cada uno de los SNP se encontró que para todos los polimorfismos la n osciló entre 200 y 600 muestras, por lo que se determinó que se analizarían 600 muestras, a excepción del SNP rs9466314 en el gen PRL que la N requerida para su análisis es de 157778.

#### **40 FRECUENCIAS GENOTÍPICAS EN LOS GENES GH1 (SNP RS2665802) Y CSH1 (SNP RS2955245).**

Al realizar el análisis del SNP rs2665802 (GH1) (Tabla 20) identificamos que el genotipo homocigoto del alelo A se encontró con mayor frecuencia (53.0%) en los casos, mientras que en los controles el genotipo más abundante fue el homocigoto del alelo T (38.9%). Los valores fueron estadísticamente significativos ( $p < .0001$ ). Los resultados indican que el genotipo (A/T) reduce el riesgo a CM ( $OR = 0.4$  CI 95% = 0.25-0.63), así mismo los portadores del genotipo homocigoto del alelo T presentan una disminución al riesgo a CM ( $OR = 0.3$  CI 95% = 0.01-0.08). La presencia del alelo T en nuestra población se comportó como un alelo protector de CM, nuestro grupo control se encuentra dentro del EHW y nuestro grupo de casos se encuentra fuera del EHW.

Para el SNP rs2955245 (CSH1) (Tabla 20) el genotipo más frecuente tanto en casos como controles, fue el homocigoto para el alelo C con el 49.6% y 42.9% respectivamente. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0.02$ ). En nuestro grupo control la población se encuentra dentro del EHW y nuestra población de casos se encuentra en desequilibrio de EHW. Para este polimorfismo los valores de OR no evidenciaron alelos de riesgo o protección a CM.

Tabla 20 Frecuencias genotípicas en los genes GH1 (SNP rs2665802) y CSH1 (SNP rs2955245).

Gen	SNP	Genotipos	Casos	Controles	p	OR	CI 95%
GH1	rs2665802 (A→T)	N	202	209	<.0001	1	0.25-0.63
		AA	107(53.0%)	40 (19.9%)		0.4	
		AT	88 (43.6%)	87 (41.2%)		0.3	
		TT	7 (3.5%)	82 (38.9%)		0.01-0.08	
		EHW	4.87	3.66			
CSH1	rs2955245 (C→T)	N	365	301	0.02	1	0.52-1.02
		CC	181(49.6%)	129(42.9%)		0.73	
		CT	131(35.9%)	128(42.5%)		0.86	
		TT	53(14.5)	44(14.6%)		0.55-1.34	
		EHW	12.30	1.73			
Equilibrio de Hardy – Weinberg (EHW)(P>0.05),X²=3.84							

#### 41 FRECUENCIAS GENOTÍPICAS EN EL GEN IGF-1 (SNP RS35765 Y SNP RS2955245).

El SNP rs35765 (IGF-1) el genotipo más frecuente en casos y controles fue el homocigoto para el alelo T con el 88.4% y 86.0% en casos y controles respectivamente. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa (p=0.039) para los grupos. Ambos grupos se encuentran en EWH (Tabla 21).

El SNP rs2955245 (IGF-1) el genotipo más frecuente en casos y controles fueron los homocigotos del alelo C con el 60.4% y 55.1% respectivamente siendo estadísticamente diferentes ( $p=0.028$ ). ambos grupos se encuentran en EWH (Tabla 21). Los valores de OR no evidenciaron alelos de riesgo o protección.

Tabla 21 Frecuencias genotípicas de los SNP rs35765 y rs2955245 (IGF-1).

Gen	SNP	Genotipos	Casos	Controles	p	OR	CI 95%
IGF-1	rs35765 (T → G)	N	363	328	0.039	1	
		TT	321(88.4%)	282 (86.0%)		0.86	0.54-1.37
		TG	39 (10.7%)	40 (12.2%)		0.44	0.11-1.77
		GG	3(0.8%)	4(1.8%)			
		EHW	2.32	3.79			
	rs2955245 (C→T)	N	283	243	0.028	1	
		AA	10 (3.5%)	11 (4.5%)		1.14	0.47-2.82
		AC	102 (36.0%)	98 (40.3%)		1.4	0.58-3.4
		CC	171 (60.4%)	134 (55.1%)			
		EHW	1.30	1.73			
Referencia=(EHW)(P>0.05),X²=3.84							

## **42 FRECUENCIAS GENOTÍPICAS EN EL GEN DE LA PRL (SNP RS2244502 Y SNP RS9466314)**

Para el SNP rs2244502 (PRL) el genotipo más frecuente en casos y controles fue los homocigotos del alelo A con el 64.5% y 63.0% respectivamente. Fueron estadísticamente diferentes ( $p=0.036$ ) y ambos grupos se encuentran fuera del EWH. El genotipo A/A del SNP rs9466314 (PRL) estaba presente en 100% de los casos y en el 99.4% controles, en ambos grupos se observó ausencia de homocigotos del genotipo T/T y solo el 0.6 % de los controles fueron heterocigotos, para este SNP (A/T). Los cálculos para OR y EHW fueron (Tabla 22)



Tabla 22 Frecuencias genotípicas de los SNP rs2244502 y rs9466314 (PRL).

Gen	SNP	Genotipos	Casos	Controles	p	OR	CI 95%
PRL	rs2244502 (A→T)	N	273	273	0.036	1	0.71-1.53
		AA	176 (64.5%)	172 (63.0%)			
		AT	78 (28.6%)	73 (26.7%)			
		TT	19 (7.0%)	28 (10.3%)			
		EHW	5.96	17.97			
	rs9466314 (A→)	N	325	321			
		AA	325 (100%)	319 (99.4%)			
		AT	0	2 (0.6%)			
		TT	0	0			
		EHW	0	0.0031			
Referencia=(EHW)(P>0.05),X <sup>2</sup> =3.84							

#### 43 FRECUENCIAS GENOTÍPICAS EN EL GEN PRLR (SNP RS13436213 Y SNP RS34024951)

En el SNP rs13436213 (PRLR) el genotipo más frecuente en casos y controles fue el homocigoto del alelo A con el 59.4% y 61.9% respectivamente. Fueron estadísticamente diferentes (p=0.039) y ambos grupos se encuentran dentro del EWH. Para el SNP rs34024951 el genotipo más frecuente fueron los homocigotos del alelo A con 89.9% y 84.3% en casos y controles respectivamente. Fueron estadísticamente diferentes (p=0.012) y en ambos grupos estuvieron ausentes los

homocigotos del alelo T, el genotipo A/T se asoció con una disminución al riesgo a CM (OR=0.62 95%CI 0.39-0.98). Ambos grupos se encuentran en el EWH (Tabla 23)

Tabla 23 Frecuencias genotípicas de los SNP rs13436213 y rs34024951 (PRLR).

Gen	SNP	Genotipos	Casos	Controles	p	OR	CI 95%
PRLR	rs13436213 (A→T)	N	399	292	0.039	1	
		AA	237(59.4%)	180(61.9%)		1.09	0.79-1.52
		AT	134(33.6%)	93(32.0%)		1.18	0.63-2.2
		TT	28 (7.0%)	18(6.2%)			
		EHW	2.20	1.61			
	rs34024951 (A→T)	N	353	310		1	
		AA	317(89.9%)	262(84.3%)		0.62	0.39-0.98
		AT	36(10.2%)	48(15.5%)			
		TT	0	0			
		EHW					
Referencia=(EHW)(P>0.05), X²=3.84							

#### **44 SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN GH1**

Para la secuenciación de la región promotora de la GH1 se utilizó el ADN previamente extraído de 21 pacientes de CM (casos) y 9 controles.

#### **45 AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN PROMOTORA DE GH1**

Previo a la secuenciación se realizó la amplificación de una región de 500pb que incluyen la región promotora, el exón 1 y el intrón 1 del gen GH1(Figura 11), utilizaron primers pre-diseñado Hs00349128\_CE Thermofisher® en la Figura 15 se muestra un gel de agarosa al 2%, en el carril 1 se muestra las bandas correspondientes al marcador de peso Sigma-Aldrich de 100 pb, en carril 2 corresponde al control (-) el cual es una reacción de PCR con agua, en los carriles del 3 al 12 se muestra la banda esperada de 500pb para muestra (Figura19), en la Tabla 24 se detalla cada carril con su respectiva concentracion. Posterior a la amplificación se purificó el producto utilizando EXOSAP-IT PCR PRODUCT CLEANUP REAGENT y todos los productos amplificados y purificados se llevaron a una concentración de 30ng/μl para su posterior proceso.

Tabla 24 Gel de agarosa representativo al 2% en muestras de CM

Carril	ID	Concentración ng/ $\mu$ L
1	Marcador de peso molecular de 100pb Sigma-Aldrich.	
2	Control negativo (-)	
3	CM-633	100
4	CM-634	100
5	CM-635	100
6	CM-636	100
7	CM-637	100
8	CM-638	100
9	CM-639	100
10	CM-640	100
11	CM-641	100
12	CM-642	100

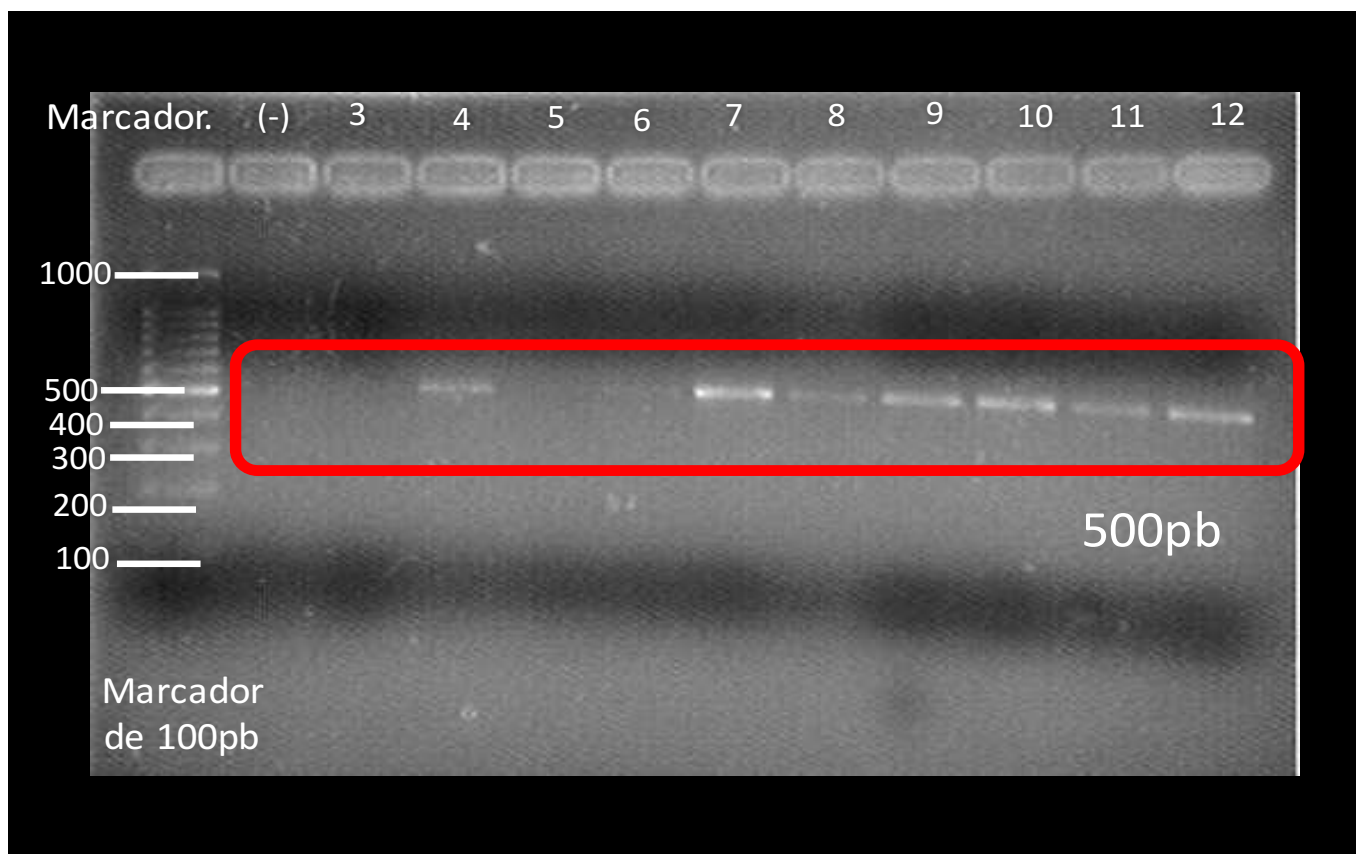


Figura 15 Gel de agarosa al 2% con amplicón de la región promotora de la GH1

## 46 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS

Todas las secuencias se ensamblaron utilizando el genoma de referencia 38 y las secuencias fueron alineadas utilizando el MEGA Molecular Evolutionary Genetics Analysis y el programa CodonCodeAligner (Figura 16).

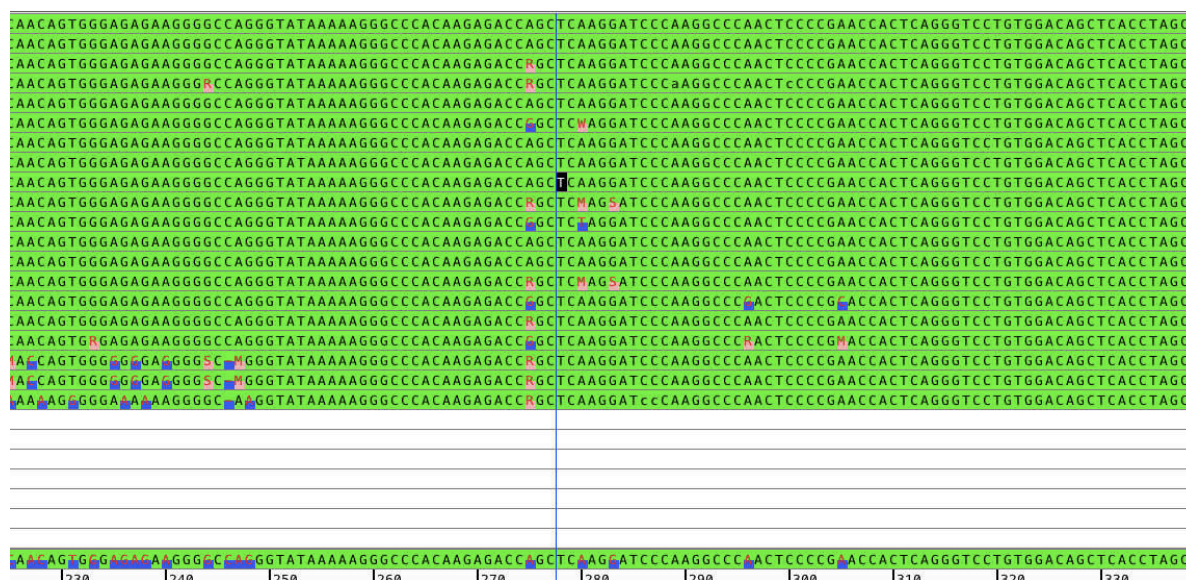


Figura 16 Análisis de secuencias con CodonCode Aligner. En la imagen se muestran en color rojo y azul las variantes en las secuencias alineadas

con estos programas se encontraron 16 variantes en los casos y 7 variantes en los controles. Posteriormente estas variantes fueron identificadas utilizando las bases de datos de ensambl, UCSC y NCBI y se encontró que, de las 16 variantes encontradas en los casos, 14 fueron previamente reportadas y que las 7 variantes encontradas en los controles habían sido previamente reportadas. Con este análisis se lograron identificar 2 nuevas variantes en los casos, estas variantes se encuentran en las posiciones 63918667 y 63918750.

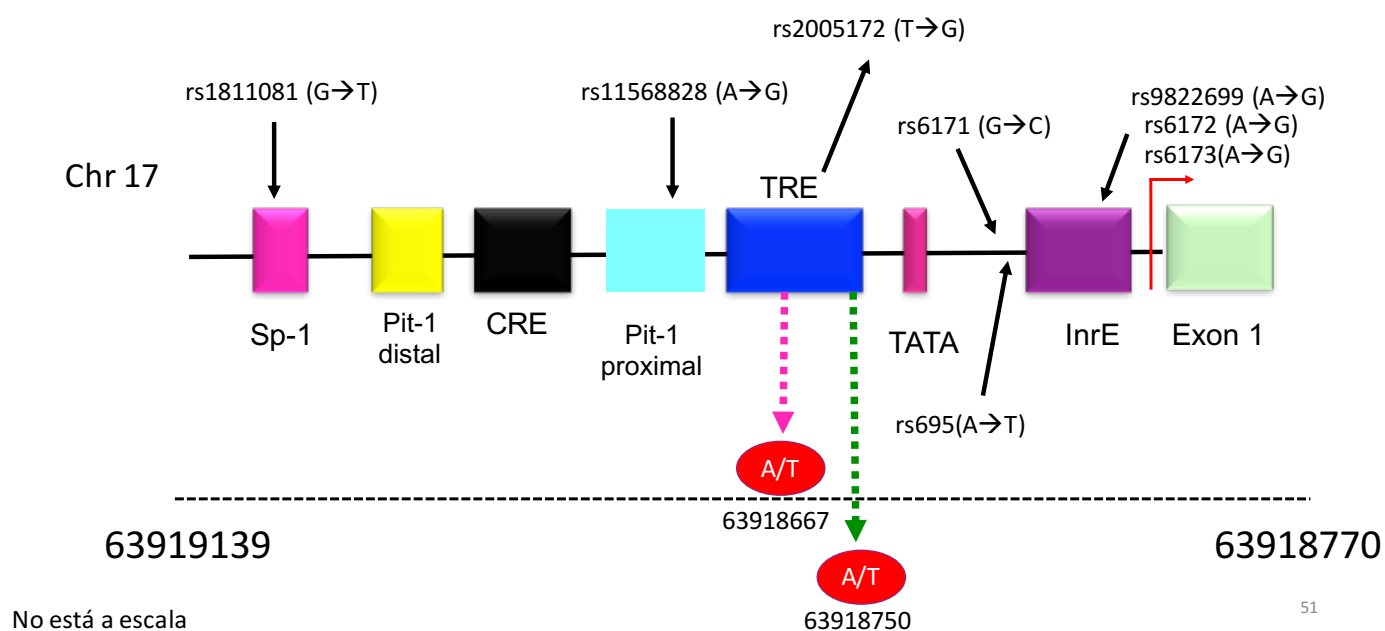


Figura 17 Región promotora del gen GH1. En esta imagen aparecen en color rojo las variantes encontradas en este trabajo localizadas en el sitio TRE el cual pertenece a la super-familia de receptores esteroideos/hormona tiroidea

Al analizar las localizaciones de las variantes identificamos que se encuentran en el sitio TRE, el cuál pertenece a la súper-familia de receptores de esteroides/hormona tiroidea. Estos recetores se unen a los elementos de respuesta hormonal (HRE), activando o reprimiendo la transcripción de genes diana específicos (Figuras 20 y 21)

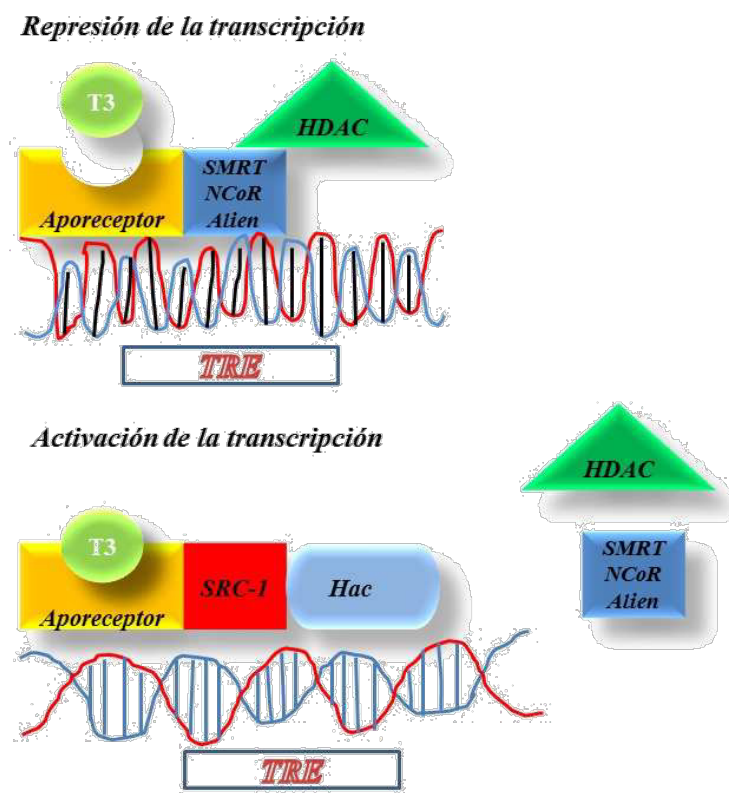


Figura 18 Receptor de unión de hormonas tiroideas/ esteroides. en este sitio se unen elementos de respuesta hormonal activando o reprimiendo la transcripción de genes diana específicos.



## CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN

El CM representa la principal causa de muerte por cáncer en mujeres a nivel mundial, este padecimiento ha presentado un incremento muy notorio en nuestro país lo cual se ha asociado al aumento de factores de riesgo como: el uso de anticonceptivos orales, cambio en patrones reproductivos, lactancia, obesidad y la inactividad física.

La edad promedio de aparición del cáncer fue de 52 años, presentándose una década antes de la que es diagnosticada en mujeres europeas o norteamericanas (14). Nuestros resultados concuerdan con lo reportado con Knaul et al., en donde reporta que en México y algunos otros países de Latinoamérica y el Caribe, la edad promedio en la que se presenta el cáncer es inferior a la de los países desarrollados. México ocupa el segundo lugar en obesidad, este factor ha sido estrechamente vinculado con el desarrollo del CM, en este estudio nuestro grupo de pacientes con CM presentó un grado mayor de obesidad (42.9%), en comparación con los controles (30.4%), siendo este valor estadísticamente significativo ( $p=0.001$ )

En la población estudiada, los casos presentaban una frecuencia mayor de uso de anticonceptivos orales con respecto a nuestros controles, (5). La American Cancer Society reporta que el uso de anticonceptivos orales incrementa 3.3 veces más el riesgo a CM. Se ha identificado que en mujeres que tienen su primer embarazo después de los 30 años, presentan un riesgo incrementado a CM, sin embargo, en nuestra población no se observó esta asociación. Esto puede deberse a que el rango de edad de nuestras pacientes y controles es diferente, la frecuencia de mujeres jóvenes es mayor dentro del grupo control (6).

La lactancia se ha considerado como un mecanismo de protección para CM, ya que este retrasa la ovulación y disminuye los niveles de estrógeno y progesterona. Russo et al (14) reportaron que el CM puede reducir la incidencia hasta en un 50% entre aquellas mujeres que amamantaron a sus hijos por largos periodos, estos

efectos no se observaron en nuestra población. Esto podría deberse a los cambios en el estilo de vida (14) de las mujeres del noreste del país, este fenómeno ha sido confirmado por estudios epidemiológicos que indican que la lactancia materna es significativamente más corta en los casos de mujeres que se les realizó una cesárea, o las que tienen nivel de estudios bajos o en madres con edades inferiores a los 25 años. Estos cambios en el estilo de vida podrían estar incrementando la incidencia de CM en las mujeres. La población estudiada no presentó diferencias significativas en la edad de la menarquia y menopausia.

El 66.1% de las pacientes con CM presentó carcinoma ductal infiltrante y el 5.9 % tenía adenoma carcinoma lobulillar. Estos datos concuerdan con los reportado por Morales et. al en donde reportan que el carcinoma más frecuente es el ductal infiltrante (80%). Al 73.8 % de los pacientes se les realizó una mastectomía, de los cuales el 58.4% fue radical.

El fenotipo CMTN presenta una colección de subtipos con distinta biología, esta es una neoplasia maligna caracterizada por la ausencia de la expresión de receptores de estrógeno, progesterona y HER2, El diagnóstico, manejo y seguimiento de estos tumores es un reto para la medicina actual, debido a que carecen de blanco terapéutico y no responden a la terapia endocrina (23). Este subtipo molecular representa aproximadamente el 21% de todos los cánceres de mama en poblaciones afroamericanas y el 15% en naciones de origen anglosajón (8). En población latina el CMTN tiene una alta incidencia con frecuencias de 21.3% en Perú, 24.6% en Venezuela, 27% en Brasil y 23.1% en México. En nuestra población identificamos que el 30% de los tumores fueron triple negativo (CMTN), cifra superior a lo anteriormente reportado. Este dato es muy relevante para nuestra población ya que el pronóstico del CMTN es malo debido a la ausencia de blanco terapéutico.

El resto de los factores de riesgo previamente descritos no presentaron diferencias estadísticas entre casos y controles (8).

En este estudio se revisaron SNP's en los genes GH1, IGF-I, CSH1, PRL y PRLR, involucrados en el desarrollo de la glándula mamaria. La asociación de estos polimorfismos con el riesgo a CM no había sido estudiada en población mexicana. En este estudio se analizó un SNP en el gen de GH1 (rs2665802), uno en el gen CSH1 (rs2955245), dos en el gen IGF-I (rs35765 y rs2162679), dos en el gen PRL (rs9466314 y rs2244502) y dos en el gen PRLR (rs34024951 y rs13436213).

En el SNP gen rs2665802 de la GH1 se encontró que entre los casos y controles había una diferencia estadísticamente significativa ( $<.0001$ ). El alelo (T) está asociado con un efecto protector al CM, el alelo (A) (18) se comporta como un alelo de riesgo y aumenta el riesgo a CM. Estos datos coinciden por lo reportado por Wagner et al en poblaciones de Alemania y Polonia, sin embargo, este SNP ha sido estudiado en cáncer colo-rectal donde se ha reportado que el alelo (A) está asociada con un efecto protector.

El SNP en el gen CSH1 (rs2955245) identificamos una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos, sin embargo no se asoció a un riesgo o protección a CM. Los polimorfismos en este gen han sido poco estudiados y para nosotros es de interés estudiar este polimorfismo ya que este gen codifica para una hormona que es exclusiva del embarazo, no se presenta en otra etapa de la vida y previamente se había asociado la presencia de esta hormona con el cáncer de próstata y mama. Chen y cols (17) estudiaron el polimorfismo en una población americana, donde reportan que no existe asociación del SNP con el CM, este resultado coincide con lo que reportamos en este estudio.

En los SNP's analizados en el gen de IGF-I (rs35765 y rs2162679) identificamos que ambos se presentaban diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, sin embargo, no se asociaron a riesgo o protección al CM. Estos SNP's han sido estudiados con anterioridad por Cazan et al (24) y ellos reportan que los SNPs se encuentran en un haplotipo que incrementa el riesgo a CM, nuestros resultados no coinciden con lo reportado por estos autores (20).

El SNP (rs2244502) en el gen de PRL fue estadísticamente significativo ( $p = 0.036$ ), mas no se encontró que estuviera asociado con un efecto protector o de riesgo al CM. En el SNP rs9466314 en este mismo gen, se encontraron ausentes los homocigotos del alelo T en casos y controles, mientras que en los controles solo se encontraron 2 heterocigotos (A/T). El proyecto de los 1000G reporta que para el continente americano el alelo (T) se encuentra ausente, esta misma base de datos muestra que para población mexicana la frecuencia genotípica para (A/A) de 0.984, para (A/T) de 0.016 y para (T/T) de 0. Estos datos son similares a los encontrados en nuestros controles.

En los SNPs del PRLR se encontró que rs13436213 fue estadísticamente significativo ( $p = 0.039$ ), sin embargo, no se encontró asociación con un efecto protector o de riesgo a CM. Sulggi et al (16) (22) reportaron el que este SNP estaba asociado con un incremento al riesgo a CM, estos datos no coinciden con lo reportado en este estudio.

Para el SNP rs34024951, en ambos grupos se encontraron ausentes los homocigotos del alelo T, estos datos coinciden con lo reportado con el proyecto de los 1000G donde la frecuencia genotípica es: (C/C) 0.875 (C/T) 0.125 y (T/T) 0, en este estudio se encontró que el genotipo (A/T) confiere un efecto protector a CM, estos datos coinciden con lo reportado por Lee et al.

Las variaciones genéticas dentro del gen GH1 han sido reportadas por diferentes autores (22), sin embargo el enfoque de estos autores fue en enfermedades relacionadas con deficiencia a la hormona del crecimiento, según los reportes hasta la fecha, este estudio es de los primeros en enfocar las variaciones de la región promotora de este gen al CM, nuestros resultados arrojaron un total de 16 variantes en casos y 7 en controles. Se revisaron las bases de datos y encontramos que de las 16 variantes, 14 habían sido reportadas y de los controles las 7 ya estaban identificadas. En resumen se lograron identificar dos nuevas variantes en las posiciones 63918667 y 63918750, las cuales se encuentran en la región TRE del promotor, esa región es un sitio de unión a elementos de

respuesta hormonal (HRE), activando o reprimiendo la transcripción de genes diana específicos. Con estos hallazgos nos resulta ahora de gran interés rastrear estos nuevos polimorfismos en el resto de las muestras de ADN del Biobanco para analizar si su presencia incrementa el riesgo a desarrollar CM.

## **CAPÍTULO V CONCLUSIONES**

La obesidad y el uso de AO fueron identificados como factores de riesgo para desarrollar CM en población del noreste de México.

En este estudio no se asoció la lactancia materna con la disminución del riesgo a CM.

Se identificó que el 30% de las pacientes presentaron cáncer de mama triple negativo (CMTN), la cual es una incidencia alta comparada con otras poblaciones en Latinoamérica y países desarrollados.

Se encontró que los polimorfismos rs2665802 y rs34024951 en los genes GH1 y PRLR confieren un efecto protector en la población estudiada.

Se encontraron 2 nuevas variantes en el promotor de la GH1, las cuales podrían estar implicadas en el riesgo a CM.

## BIBLIOGRAFÍA

1. **Thompson&Thompson.** *Genetica en Medicina*. Barcelona : Elsevier-Masson S.A , 2008. Vol. 7.
2. **Mamaria, Compendio de Patología.** [<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/documentos/DOCSAL7205.pdf>]. [En línea]
3. **informativas/deteccion-diagnostico/estadificacion], Estadificación del cáncer** [<http://www.cancer.gov/espanol/recursos/hojas-informativas/deteccion-diagnostico/estadificacion>]. [En línea]
4. **Edition, Cancer taging Manual Seventh.** [[www.cancerstaging.net](http://www.cancerstaging.net)]. [En línea]
5. **MERIC N C NCER SOCIETY. 20 5, “ lobal Cancer Facts & Fi res 3rd Edition”.** Atlanta. [<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/document/acspc-044738.pdf>]. [En línea]
6. *Políticas públicas para la detección del cáncer de mama en México.* **Martínez-Montañez OG U-ZP, Hernández-Ávila M.** 2, 2009, Salud Publica Mex, Vol. 51, págs. S350- S360.
7. **Diagnóstico, Cáncer de mama.** [[http://www.cdc.gov/spanish/cancer/breast/basic\\_info/diagnosis.htm](http://www.cdc.gov/spanish/cancer/breast/basic_info/diagnosis.htm)]. [En línea]
8. *Triple-negative breast cancer: a short review.* **AD, Elias.** 6, 2009, Am J Clin Oncol , Vol. 33, págs. 637-645.
9. *Guía práctica del cáncer de mama para las mujeres de Nuevo León.* **Sd, Salud.** 2009. [<http://www.nl.gob.mx/publicaciones/guia-practica-del-cancer-de-mama-para-las-mujeres-de-nuevo-leon>].
10. *Tratamiento hormonal para el cáncer de mama.* . **IH, Cabrera.** 7, 2009, Oncol , Vol. 27, págs. 427-434.
11. **Cancer, Detailed Guide: Breast.** [<http://www.cancer.org/Cancer/BreastCancer/DetailedGuide/index>]. [En línea]
12. *Genetic susceptibility to breast cancer.* **MAVADDAT, N., ANTONIOU, A., EASTON, D., GARCÍA-CLOSAS, M.** 3, Molecular Oncology, Vol. 4, págs. 174-191.
13. **AMERICAN CANCER SOCIETY. 20 4 c.** [<http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-risk-factors>]. [En línea]
14. *Laboratory assessment of the status of eHr-2/neu protein and oncogene in breast cancer especimens: comparison of immunohistochemistry assay with fluorescent in situ hybridization assay.* **Wang, S., Saborean, M. H., Frenkel, E. et al.** 2000, J Clin Pathol, Vol. 53, págs. 374-381.
15. *Overview of treatment results whith Trastuzumab (Herceptin) in metastatic breast cancer.* **Hortobagyi, G. N.** 2001, Semin Oncol,, Vol. 28, págs. 43-47.

16. *The emerging landscape of breast cancer susceptibility*. **STRATTON, M., RAHMAN, N.** 1, 2008, *Nature Genetics*, Vol. 40, págs. 17-22.
17. *Novel Biomarkers in the Continuum of Breast Cancer*. **WALSH, M. F., NATHANSON, K. L., COUCH, F. J., & OFFIT, K.** [ed.] Springer International Publishing. *Genomic Biomarkers for Breast Cancer Risk*. , págs. 1-32.
18. *Análisis de genes de baja penetrancia asociados con cáncer de mama familiar para pacientes del sur occidente colombiano*. **CIFUENTES, L., JARA, L., HORMAZÁBAL, P. G., & BARRETO, G.** 4-S, 2010, *latreia*, Vol. 23, pág. 25.
19. *Other breast cancer susceptibility genes: searching for more holy grail*. **NATHANSON, K. L., & WEBER, B. L.** 7, 2001, *Human molecular genetics*, Vol. 10, págs. 715-720.
20. *Architecture of inherited susceptibility to common cancer*. **FLETCHER, O. AND HOULSTON, R.S.** 5, 2010, *Nature Reviews Cancer*, Vol. 10, págs. 353-361.
21. *The emerging landscape of breast cancer susceptibility*. **STRATTON, M., RAHMAN, N.** 1, 2008, *Nature Genetics*, Vol. 40, págs. 17-22.
22. *Large-scale genotyping identifies 41 new loci associated with breast cancer risk*. **MICHAILIDOU, K., HALL, P., GONZALEZ-NEIRA, A., GHOUSSAINI, M., DENNIS, J., MILNE, R. L.** 4, 2013, *Nature genetics*, Vol. 45, págs. 353-361.
23. *Breast cancer susceptibility: current knowledge and implications for genetic counselling*. **RIPPERGER, T., GADZICKI, D., MEINDL, A., & SCHLEGELBERGER, B.** 6, 2009, *European Journal of Human Genetics*, Vol. 17, págs. 722-731.
24. *Polygenes, risk prediction, and targeted prevention of breast cancer*. **PHAROAH, P. D., ANTONIOU, A. C., EASTON, D. F., & PONDER, B. A.** 2008. 26, *New England Journal of Medicine*, Vol. 358, págs. 2796-2803.
25. *Association of gene polymorphisms in prolactin and its receptor with breast cancer risk in Taiwanese women*. **Mong, F. Y., Kuo, Y. L., Liu, C. W., Liu, W. S., & Chang, L. C.** 7, 2011, *Molecular biology reports*, Vol. 38, págs. 4629-4636.
26. *How pregnancy at early age protects against breast cancer*. **Meier-Abt, F., & Bentires-Alj, M.** 3, s.l. : CELL, 2014, *Trends in molecular medicine*, Vol. 20, págs. 143-153.
27. *The emerging landscape of breast cancer susceptibility*. **Stratton, M., Rahman, N.** **Nature Genetics**, 40 (1), 17-22. 1, *Nature Genetics*, Vol. 40, págs. 17-22.
28. *Clasificación molecular del cáncer de mama*. **IMIGO G, Felipe, MANSILLA S, Edgardo, DELAMA G, Ignacio.** 11, 2011, *Cuad. cir. (Valdivia)*. [online], Vol. 25, págs. 67-74.
29. *Identification of novel susceptibility genes for breast cancer-genome-wide association studies or evaluation of candidate genes?*. **Meindl, A.** 4, 2009, *Brast Care*, págs. 93-99.
30. *"Other" breast cancer susceptibility genes*. **Nathanson, K. Weber, B.** 7, 2001, *Hum Mol Genet*, Vol. 10, págs. 715-720.
31. *Protective role of pregnancy in breast cancer*. **Jose Russo, Raquel Moral, Gabriela A. Balogh, Daniel Mailo and Irma H. Russo.** 2005, *Breast cancer research*, Vol. 7. 131-142.



32. *Breastfeeding Mode and Risk of Breast Cancer: A Dose–Response Meta-Analysis*. **Mishel Unar-Munguía, PhD1, Gabriela Torres-Mejía, PhD2, M. Arantxa Colchero, PhD3, and Teresita González de Cosío, PhD4.** 2, *Journal of Human Lactation*, Vol. 33, págs. 422–434.
33. *Do Placental Genes Affect Maternal Breast Cancer? Association between Offspring's CGB5 and CSH1 Gene Variants and Maternal Breast Cancer Risk.* **Yu Chen1, Muhammad G. Kibriya2, Farzana Jasmine2, Regina M. Santella3, Ruby T. Senie4, and Habibul Ahsan5.** 23, 2008, *Cancer Res*, Vol. 68, págs. 9729–9734.
34. *A comprehensive analysis of common genetic variation in prolactin (PRL) and PRL receptor (PRLR) genes in relation to plasma prolactin levels and breast cancer risk: the Multiethnic Cohort.* **Sulggi A Lee\*1, Christopher A Haiman1, Noel P Burt3, Loreall C Pooler1, Iona Cheng8, Laurence N Kolonel2, Malcolm C Pike1, David Altshuler3,4,5,6, Joel N Hirschhorn3,6,7, Brian E Henderson1 and Daniel O Stram1.** 72, 2007, *BMC Medical Genetics*, Vol. 8, págs. 1471-2350.
35. *Association of a Common Polymorphism in the Human GH1 Gene with Colorectal Neoplasia.* **Loïc Le Marchand, Timothy Donlon, Ann Seifried, Rudolf Kaaks, Sabina Rinaldi, Lynne R. Wilkens.** 6, 2002, *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 94.
36. *Patients with congenital deficiency of IGF-I seem protected from the development of malignancies: A preliminary report.* **O. Shevah, Z. Laron.** 1, *Growth Hormone & IGF Research*, Vol. 17, págs. 54-57.
37. *The GH1/IGF-1 axis polymorphisms and their impact on breast cancer development.* **Hemminki, Kerstin Wagner & Kari.** 3, *Breast cancer research and treatment*, Vol. 10, págs. 233-248.
38. *Genetic variation in PRL and PRLR, and relationships with serum prolactin levels and breast cancer risk: results from a population- based case-control study in Poland.* **Sarah J Nyante1\*, Jessica M Faupel-Badger2, Mark E Sherman1, Ruth M Pfeiffer1, Mia M Gaudet3, Roni T Falk1, Abegail A Andaya1, Jolanta Lissowska4, Louise A Brinton1, Beata Peplonska5, Barbara K Vonderhaar6, Stephen Chanock7, Montserrat Garcia-Closas8 and Jonine D Figueroa1.** 2, 2011, *Breast Cancer Research*, Vol. 13, pág. R42.
39. *Transcriptional control of GH expression and anterior pituitary development.* **Theill, L. E., & Karin, M.** 6, 1993, *Endocrine reviews*, Vol. 14, págs. 670- 689.
40. **2015, INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA Y GEOGRFICA.** Estadísticas a propósito del... día mundial de la lucha contra el cáncer de mama ( 9 de octubre). <http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2015/mama0.pdf>. [En línea]
41. *Cáncer de mama triple negativo: una enfermedad de difícil diagnóstico y tratamiento.* **Zaharia, M., & Gómez, H.** 4, 2013, *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, Vol. 30, págs. 649-656.
42. *Polymorphisms of genes coding for insulin-like growth factor 1 and its major binding proteins, circulating levels of IGF-I and IGFBP-3 and breast cancer risk: results from the EPIC study.* **Canzian, F., McKay, J. D., Cleveland, R. J., Dossus, L., Biessy, C., Rinaldi, S., ... & Clavel-Chapelon, F.** 2, 2006, *British journal of cancer*, Vol. 94, pág. 299.

43. *Association of polymorphisms and haplotypes in the human growth hormone 1 (GH1) gene with breast cancer.* **Wagner K, Hemminki K, Israelsson E, Grzybowska E, Klaes R, Chen B.** 4, 2005, *Endocrinol Relat Cancer.*, Vol. 12, págs. 17-28.
44. **Sergeant, ESG, 2017. Available at: <http://epitools.ausvet.com.au>.** Epitools epidemiological calculators. Ausvet Pty Ltd. [En línea] 2017. <http://epitools.ausvet.com.au>.